

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2017

Kateřina Mrázová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STRUKTURA A VLASTNOSTI BAKTERIÁLNÍHO BIOFILMU

STRUCTURE AND PROPERTIES OF BACTERIAL BIOFILMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kateřina Mrázová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1151/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Kateřina Mrázová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Struktura a vlastnosti bakteriálního biofilmu

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše
2. Studium základních biologických, chemických a fyzikálních vlastností biofilmů u bakterií schopných akumulace PHA

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Kateřina Mrázová
student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá studiem základních vlastností buněk biofilmu PHA produkujících bakterií, konkrétně *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*. Pro porovnání jednotlivých typů buněk byly provedeny dva typy kultivací: jednak byly buňky kultivovány ve speciálním bioreaktoru, čímž byla připravena kultura obsahující jak volné planktonické, tak přisedlé biofilmové buňky, a pro porovnání pak byla provedena kultivace na Petriho miskách. V praktické části byla stanovována afinita jednotlivých typů buněk k hydrofobní fázi pomocí metody BATH, kdy bylo zjištěno, že přisedlé buňky ať biofilmové z bioreaktoru či odebrané z Petriho misek, převážně ochotněji přecházejí do hydrofobní fáze než volné planktonické buňky. Dále byla pomocí dynamického rozptylu světla (DLS) stanovována velikost jednotlivých typů buněk a také jejich Zeta potenciál. Pro studované vzorky bylo zjištěno, že buňky ve vzorcích mají tendenci agregovat a rozdíl ve velikostech obou typů buněk se projevuje pouze pro biofilm bakterie *Burkholderia cepacia*. V neposlední řadě byl sledován vliv přítomnosti jednotlivých typů bakteriálních buněk na povrchové napětí vody a také rozdílné množství PHA kumulovaného v jednotlivých typech buněk.

ABSTRACT

This thesis deals with the study of basic properties of cells of bacterial biofilm produced by PHA producing bacteria, specifically *Burkholderia cepacia* and *Burkholderia sacchari*. Two cultivation approaches were used to compare different types of cells: at first, the cells were cultivated in bioreactor providing both planktonic and biofilm attached cells, secondly, cells grown on Petri dishes were also included in the study. In experimental part the affinity of each type of cells to hydrophobic phase was studied using BATH method. It was found that sessile cells, either biofilm associated cells as well as cells taken from Petri dishes, prefer hydrophobic phases more than planktonic cells. Also size and Zeta potential were measured using Dynamic Light Scattering (DLS). It was found for studied samples that, cells in these samples tend to aggregate and the difference of size between both types of cells occurs only for biofilm of the strain *Burkholderia cepacia*. Finally the impact of presence various bacterial cells types on surface tension of water as well as amount of PHA cumulated in different types of cells were observed.

KLÍČOVÁ SLOVA

Bakteriální biofilm, planktonické buňky, BATH, povrchové napětí, polyhydroxyalkanoáty.

KEYWORDS

Bacterial biofilm, planktonic cells, BATH, surface tension, polyhydroxyalkanoates.

MRÁZOVÁ, K. Struktura a vlastnosti bakteriálního biofilmu. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 42 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za jeho cenné rady, připomínky a čas, který mi věnoval během zpracovávání této práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Pavle Benešové a Ing. Evě Slaninové za jejich trpělivost, vstřícnost a pomoc při realizaci experimentů. V neposlední řadě patří můj dík také Ing. Jitce Krouské, Ph.D. za její ochotu a čas, který mi věnovala při konzultacích.

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Bakteriální biofilm.....	8
2.1.1	Charakteristika.....	8
2.1.2	Vybrané druhy bakterií tvořící biofilmy.....	8
2.2	Vznik biofilmu.....	9
2.2.1	Proces vzniku.....	9
2.2.1.1	Adheze buněk k povrchu.....	9
2.2.1.2	Zrání (maturace).....	10
2.2.1.3	Oddělení bakteriálních buněk.....	10
2.2.2	Vlivy.....	10
2.2.3	Inhibice tvorby biofilmu.....	11
2.2.3.1	Antimikrobiální povlaky.....	11
2.2.3.2	Modifikace polymeru.....	11
2.2.3.3	Změna hydrofobních vlastností nebo drsnosti povrchu.....	11
2.2.3.4	Polysacharidy a enzymy zamezující vzniku biofilmu.....	11
2.3	Struktura a vlastnosti.....	12
2.3.1	Struktura.....	12
2.3.2	Mezibuněčná komunikace – <i>quorum sensing</i>	13
2.3.3	Resistance biofilmových buněk vůči stresovým podmínkám.....	13
2.3.3.1	Zpoždění průniku antimikrobiálních látek do biofilmu.....	14
2.3.3.2	Změna rychlosti růstu bakterií v biofilmu.....	14
2.3.3.3	Stresová odpověď.....	14
2.3.4	Hydrofobní vlastnosti.....	16
2.3.5	Polyhydroxyalkanoáty.....	16
2.4	Specifické metody a techniky pro studium biofilmů.....	17
2.4.1	BATH.....	17
2.4.2	Studium povrchového napětí.....	18
2.4.2.1	Du Noüyho kroužek.....	18
2.4.2.2	Metoda maximálního tlaku bubliny.....	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	21
3.1	Použité bakterie, chemikálie a přístroje.....	21
3.1.1	Použité bakterie.....	21
3.1.2	Použité chemikálie.....	21
3.1.3	Použité přístroje.....	21
3.2	Kultivace bakteriálního biofilmu.....	21
3.2.1	Příprava inokula.....	21
3.2.2	Kultivace kultur na Petriho miskách.....	22
3.2.3	Kultivace bakteriálního biofilmu.....	22
3.3	Provedení BATH testů.....	22

3.4	Měření povrchového napětí	25
3.5	Stanovení PHA.....	25
3.5.1	Příprava kalibračních roztoků	25
3.5.2	Příprava vzorků	25
4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	27
4.1	BATH testy	27
4.2	Povrchové napětí.....	32
4.2.1	Du Noüyho kroužek	32
4.2.2	Metoda maximálního tlaku bubliny	32
4.3	Stanovení PHA plynovou chromatografií.....	34
5	ZÁVĚR.....	36
	LITERATURA.....	38
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	42

1 ÚVOD

Bakteriální biofilm je uskupení jednoho nebo více druhů bakterií, které jsou přichyceny k povrchu. Pro bakteriální buňky je tato životní forma upřednostňovaná před volnou planktonickou. Bakteriální biofilmy mohou ulpívat jak na abiotických tak na biotických površích a jsou tak původci řady onemocnění obzvláště pak u pacientů s cystickou fibrózou. Ideální prostředím pro tvorbu biofilmu je fázové rozhraní kapalina – pevná látka.

Biofilm vzniká v několika krocích. Nejprve dochází k adhezi buněk k povrchu, následuje zrání, kdy již ireverzibilně navázané bakterie vytváří mikrokolonie a buňky se dále dělí. Mezi jednotlivými buňkami dochází také k tvorbě extracelulární matrix, převážně složené z polysacharidů. Po dosažení rovnováhy pak dochází k vytváření planktonických buněk, které se oddělují, mohou se šířit a vytvářet nový biofilm. Tvorbu biofilmu a oddělování planktonických buněk ovlivňuje množství živin, kumulace metabolitů, případně teplota či pH prostředí.

Bakteriální biofilmy vytváří heterogenní prostředí jak při zastoupení více druhů bakterií, tak i jednoho druhu. V rámci biofilmu buňky totiž zastávají odlišné funkce v závislosti na daných podmínkách prostředí. Díky vytvoření biofilmu jsou bakteriální buňky odolnější nejen vůči vlivům změn okolního prostředí, ale také vůči antimikrobiálním látkám. Důvodem, proč jsou biofilmové buňky odolnější než buňky planktonické, je pravděpodobně pomalý růst biofilmových buněk a jejich fyziologická odlišnost. U biofilmových buněk dochází například snadněji k adhezi k hydrofobním povrchům. V rámci biofilmu probíhá také mezibuněčná komunikace především pomocí *quorum sensing*. Tato mezibuněčná komunikace je založená na regulaci genové exprese, kdy jsou vylučovány signální molekuly v závislosti na počtu buněk vyskytujících se v bakteriálním biofilmu.

Mezi důležité vlastnosti buněk bakteriálního biofilmu patří hydrofobicita. To, jak moc jsou buňky hydrofobní, ovlivňuje vytváření biofilmu. Čím více hydrofobně bude buňka vystupovat, tím jednodušeji bude ulpívat na hydrofobním povrchu a bude tak umožněno vytváření mikrokolonií až zralého bakteriálního biofilmu. Právě porovnání hydrofobních vlastností buněk biofilmu a planktonických, spolu se studiem tvorby polyhydroxyalkanoátů v obou typech buněk bylo cílem této práce.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Bakteriální biofilm

2.1.1 Charakteristika

Biofilmy jsou uskupení jedné nebo více druhů bakterií, které jsou přichyceny na abiotický či biotický povrch pomocí extracelulárních polymerních látek. Vyskytují se téměř ve všech vlhkých prostředích, ve kterých je dostatečný přísun živin. Tvorbu a následný vývoj biofilmu ovlivňuje odlišná genová exprese u buněk biofilmových a planktonických [1]. Biofilmy jsou geneticky různorodé a také vyžadují rozdílné vlastnosti prostředí. Biofilm, přisedlá životní forma, je upřednostňovaná forma výskytu, která bakteriím poskytuje ochranu před negativními vlivy prostředí, umožňuje jim šířit se a také jsou takto vyskytující se bakterie vysoce odolné vůči působení antibiotik. Volnou životní formu pak představují buňky planktonické. Biofilmy mají své využití v biotechnologiích, jejich výskyt v průmyslu či zdravotnictví je ale vysoce nežádoucí, protože vystupují jako původci řady onemocnění. Mohou způsobovat chronické infekce, jako chronické osteomyelitidy, záněty močového měchýře, nebo zápal plic u pacientů s cystickou fibrózou [2].

Přibližně 97 % biofilmu tvoří voda, která je vázána ke kapsli mikrobiálních buněk a proces difuze v mikrobiální matrix je ovlivněn schopností vázat vodu společně s pohyblivostí biofilmu. Kromě vody a mikrobiálních buněk se v matrix nachází veškeré hlavní druhy makromolekul, jako například proteiny, sacharidy, nukleové kyseliny, fosfolipidy, lipidy a jiné. Matrix je tedy komplex vyloučených polymerních látek, absorbovaných živin a metabolitů, produktů lýzy buněk a také částic a organických zbytků z okolního prostředí. Přesun hmoty v biofilmu je ovlivněn jeho strukturou, která závisí na daném substrátu. Transport látek obsažených v matrix probíhá díky systému pórů a kanálků případně difuzí v částech biofilmu, které jsou tvořeny hustšími agregáty [1].

2.1.2 Vybrané druhy bakterií tvořící biofilmy

Komplex *Burkholderia cepacia* je skupina několika druhů bakterií velmi podobných fenotypově, ale geneticky odlišných, které se vyskytují v různých prostředích jako například v půdě, vodě, nebo povrchu kořenů rostlin. Tyto organismy jsou jak velmi užitečné, pomáhají chránit rostliny před škůdci, vystupují jako rhizobakterie podporující růst rostlin, nebo také zajišťují degradaci toxických látek, tak mohou ale působit jako patogeny, například pro pacienty s cystickou fibrózou [3]. Tyto bakterie vytváří spoustu virulentních faktorů díky jejich flexibilní genomové struktuře a různorodé metabolické aktivitě. Nebezpečí pro pacienty trpícími tímto onemocněním představuje také to, že jsou tyto biofilm tvořící bakterie odolné vůči většině běžně používaných antibiotik. Kvůli poškozenému proteinu CFTR („*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*“ protein způsobující toto onemocnění) mají plíce pacientů tendenci dehydratovat sliznice a to poskytuje ideální prostředí pro bakterie, aby vytvářely biofilm, takže pokud se bakterie dostanou do dýchacího traktu pacienta, snadno se uchycují na povrchu sliznic [4], [5].

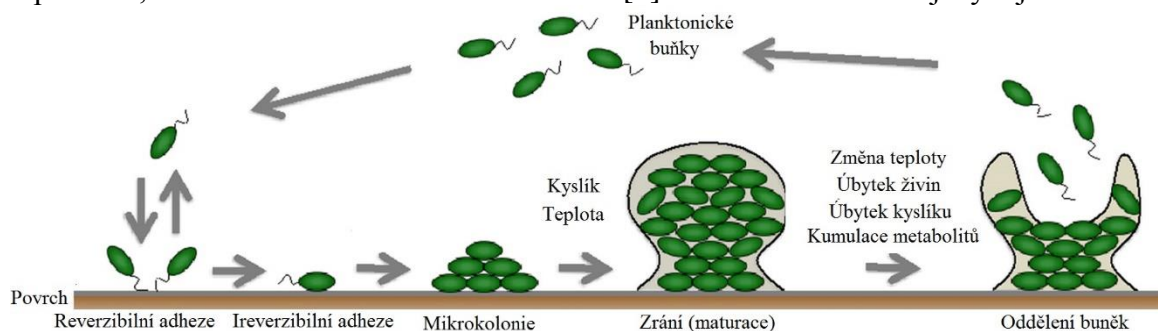
Burkholderia cepacia patří mezi bakterie, které jsou schopné kumulovat polyhydroxyalkanoáty. Tato Gram negativní bakterie je schopná využívat různé druhy uhlíku k tvorbě polyhydroxyalkanoátů jako je polyhydroxybutyrát P(3HB) [6].

Burkholderia sacchari je bakterie dalším druhem, který je schopen ve své buňce kumulovat polyhydroxyalkanoáty. Tato bakterie pro tvorbu těchto polymerů využívá jak hexózu, tak pentózu jako substrát. Tento druh je schopen kumulovat ve svých buňkách jak polyhydroxybutyrát P(3HB), tak kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 4-hydroxybutyrátu P(3HB-co-4HB) případně kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu P(3HB-co-3HV) [7].

2.2 Vznik biofilmu

2.2.1 Proces vzniku

Vznik biofilmu je soubor několika fází, kdy bakterie rostou na určitém povrchu a produkují extracelulární matrix [1]. V každé z těchto fází se buňky od sebe fyziologicky liší a v již vzniklém biofilmu se mohou jednotlivé fáze nacházet současně. Tvorba biofilmu je ovlivňována různými genetickými faktory, jako pohyblivost bakterií, membránové proteiny, extracelulární polysacharidy anebo různé signální molekuly, spolu s vlastnostmi prostředí, ve kterém se buňky nacházejí. Růst biofilmu můžeme rozdělit na 3 hlavní části: adheze buněk k povrchu, zrání a oddělení bakteriálních buněk [2]. Obrázek 1 znázorňuje tyto jednotlivé části.



Obrázek 1: fáze tvorby biofilmu [8]

2.2.1.1 Adheze buněk k povrchu

Ideálním prostředím pro vznik biofilmu je rozhraní kapalina – pevná látka a vodné rozpouštědlo (například krev nebo voda). Na adhezi buněk k povrchu má vliv několik faktorů jako substrát, hydrodynamika rozpouštědla nebo vlastnosti daných bakteriálních buněk. Například bylo zjištěno, že se bakterie snadněji přichytávají na hrubých nepolárních hydrofobních površích, jako jsou plasty, než na hydrofilních materiálech jako jsou třeba sklo nebo kovy [9].

Adheze bakteriálních buněk k povrchu se dělí na 2 části: primární a sekundární. Primární fáze spočívá v kontaktu volných planktonických buněk a daného povrchu, kdy je tato interakce reversibilní, a buňky mohou být snadno od povrchu odloučeny. Aby mohlo k adhezi dojít, musí se planktonické buňky vyskytovat v dostatečné blízkosti povrchu. Transport buněk je umožněn buď tokem kapaliny, ve které se mikroorganismy nacházejí, nebo případně vlastním pohybem buněk. Jakmile jsou organismy v dostatečné blízkosti (většinou méně než 1 nm), rozhodují elektrostatické a hydrofobní interakce, teplota, hydrodynamické síly či van der Waalsovy síly o tom, jestli se buňky na daném povrchu uchytí. V sekundární fázi, dochází k ireverzibilnímu ulpívání buněk na povrchu. Bakterie začínají vytvářet extracelulární polysacharidy, které spolu se specifickými ligandy, které jsou umístěné například na fimbriích, upevňují vazbu buňky k danému povrchu [10].

2.2.1.2 Zrání (maturace)

Po tom, co jsou buňky ireverzibilně navázány na povrch, začínají se vytvářet mikrokolonie z již přisedlých bakterií a buňky se dále dělí [10]. Ve fázi zrání jsou produkovány extracelulární polysacharidy. Z jednovrstevných mikrokolonií se stávají vícevrstevné a šířka biofilmu roste až na 100 μm [2]. Zvyšuje se celková hustota biofilmu, díky množení buněk již ireverzibilně přichycených k povrchu, tvoří se extracelulární sloučeniny, které reagují s organickými i anorganickými částicemi nacházejícími se v bezprostředním okolí. Z těchto sloučenin se poté tvoří glykokalyx. Růst bakteriálního biofilmu je determinován dostupností živin, jejich pronikáním do buněk a odstraňováním odpadních látek. Mezi další vlivy patří také optimální proudění tekutiny biofilmem, pH, prostupování kyslíku nebo zdroj uhlíku [10].

2.2.1.3 Oddělení bakteriálních buněk

Po dosažení kritického bodu nastává dynamická rovnováha a vnější vrstva biofilmu začíná vytvářet planktonické organismy, které se oddělují od zbytku buněk a mohou tak vytvářet nové biofilmy na dalších površích. Buňky, které jsou teď nejbližší k povrchu, se stávají pasivními nebo zanikají díky nedostatku živin, poklesu pH nebo kumulaci toxických metabolitů vedlejších produktů [10].

2.2.2 Vlivy

Při tvorbě biofilmu dochází k ovlivňování procesu přechodu volné planktonické formy na přisedlou, biofilmovou, vlastnostmi daného prostředí jako pH, teplota, složení živin a jejich množství [11]. Při zvýšení příjmu živin, dochází k rychlejší tvorbě biofilmu. Aby mohly být živiny dále zpracovávány, je podstatná přítomnost potřebných enzymů. Enzymatické reakce jsou však závislé na teplotě, a proto je zvýšená tvorba bakteriálního biofilmu spojována s optimální teplotou kultivace biofilmu. Spolu s enzymy teplota prostředí ovlivňuje i fyzikální vlastnosti sloučenin v buňkách a jejich okolí [12]. Například bylo zjištěno, že bakterie *Pseudomonas aeruginosa* mají tendenci snadněji vytvářet biofilmy při zvýšeném obsahu glukózy v prostředí a při teplotě 37 °C ve srovnání s kultivací při teplotě 25 °C [11]. Pokud je ale teplota okolního prostředí příliš vysoká, rychlost tvorby biofilmu se naopak zpomaluje [13].

Dále byly pozorovány rozdíly v rychlosti tvorby v závislosti na toku kapaliny. Pokud sledujeme pouze paralelní a šikmý pohyb kapaliny na stejném úseku není v rychlosti tvorby významný rozdíl. Pokud ale pozorujeme rozdíly mezi povrchem na počátku šikmého toku a povrchem dále po proudu, vytváří se biofilm jednodušeji v druhém případě [13].

Také změny pH ovlivňují vznik biofilmů. Pro regulaci pH cytoplazmy může být problematická přítomnost protonové pumpy, která se nachází v membráně bakteriální buňky. Ta přenáší protony z cytoplazmy a vytváří elektrochemický gradient. Může tak docházet k pasivnímu přenosu protonů v důsledku působení síly pohánějící tento gradient. Bakterie na změny pH vnějšího prostředí i cytoplazmy reagují zvyšováním aktivity a syntézou proteinů spojených s mnoha různými procesy v buňce. Bakteriální buňky ale reagují odlišně na náhlou změnu pH a jeho pozvolné zvyšování. Studie dokazují, že pokud je pH měněno pozvolně, je šance bakteriálních buněk na přežití vyšší než když dojde k prudké změně pH například náhlým přidáním HCl. Toto naznačuje, že v bakteriálních buňkách probíhá mechanismus, který umožňuje bakteriální populaci přizpůsobit se menším změnám v pH prostředí. V bakteriálních buňkách ale probíhají také procesy, jako například tvorba extracelulárních polymerních látek, které se změnám pH přizpůsobují obtížně. Hodnota pH, která je optimální pro produkci těchto

látek, především polysacharidů, je závislá na daném druhu bakterie. Pro většinu z nich se ale tato hodnota pohybuje kolem 7 [12].

2.2.3 Inhibice tvorby biofilmu

Jakmile bakterie vytvoří biofilm, může docházet k uvolňování buněk z biofilmu a bakterie se tak mohou dále šířit a vytvářet další biofilmy. Proto, pokud je výskyt bakteriálního biofilmu nežádoucí, je nutné zabránit tomu, aby se buňky přichytily k povrchu a biofilm vytvořily, místo následné snahy tento biofilm rozrušit a tím ho odstranit. Tvorbě bakteriálního biofilmu můžeme předcházet jak chemickými tak mechanickými metodami [14].

2.2.3.1 Antimikrobiální povlaky

Chemické metody, jsou nejčastěji používané, při prevenci tvorby biofilmu. Mezi tyto metody patří například použití antimikrobiálních látek, jako jsou antibiotika, biocidní látky, případně iontové povlaky na površích. Takovéto úpravy povrchu jsou ale účinné pouze krátkou dobu, většinou týden. Jednou z účinných metod je použití stříbra. Tento způsob, ale nelze použít v živých systémech, kvůli toxickému působení stříbra na tkáň [14].

2.2.3.2 Modifikace polymeru

Pro imobilizaci antimikrobiálních látek lze využít polymerů s dlouhými flexibilními řetězci. Na daný povrch se tyto řetězce váží pomocí kovalentních vazeb. Bylo zjištěno, že pokud je antimikrobiální látka N-akrylpyridinium bromid upevněn na poly(4-vinyl-N-hexylpyridin), má polymer schopnost zabránit vazbě více jak 99% bakterií typu *Escherichia coli* nebo *Pseudomonas aeruginosa* na daný povrch, což je způsobeno disperzními silami mezi řetězci tohoto polymeru a bakteriálními buňkami [14].

2.2.3.3 Změna hydrofobních vlastností nebo drsnosti povrchu

Prvním krokem pro vznik biofilmu je ulpění volných planktonických buněk na povrchu. Vazby k povrchu jsou ale slabé a buňky mohou být odstraněny. Velkou roli v přichycení hrají i hydrofobní vlastnosti povrchu. Úprava povrchu modifikací polymeru je také efektivní způsob prevence vzniku biofilmu, který je založen na principu elektrostaticky nabitých částic, které budou odpuzovat částice se stejným nábojem. Dále bylo zjištěno, že bakterie se snadněji uchycují na hrubých površích. Hrubost povrchu také ovlivňuje jeho hydrofilní nebo hydrofobní vlastnosti, což ovlivňuje schopnost bakterií usazovat se. Proto je vhodné, aby povrchy, které by mohly přijít do kontaktu s bakteriemi, zůstávaly hladké kvůli zabránění vzniku biofilmu [14].

2.2.3.4 Polysacharidy a enzymy zamezující vzniku biofilmu

Aby se zabránilo ničení také prospěšných bakterií, začínají se hledat metody, kdy nebude nutné používat konvenční typy antibiotik. Například polysacharidy jsou schopné vystupovat jako inhibitory lektinu, což je látka, která bakteriím usnadňuje uchycení na hostitelských buňkách. Tyto proteiny hrají důležitou roli v tvorbě biofilmu a vzniku bakteriální infekce. Jejich výskyt je převážně na povrchu bakteriálních buněk a tím se mohou vázat na glykanové substráty, které se nachází na površích buněk hostitelských organismů. Tyto polysacharidové látky umožňují interakce mezi buňkami a povrchem případně jinými buňkami. Tím se podílejí na tvorbě a stabilizaci biofilmu [14].

Dále jsou to enzymy, které se mohou podílet na inhibici vytváření biofilmů, obzvláště enzymy, které degradují extracelulární matrix biofilmu. N-acetyl-D-glukosamin-1-fosfát acetyl transferáza je esenciální peptidoglykan a prekurzor lipopolysacharidu Gram pozitivních i Gram

negativních patogenních mikroorganismů. Léčba využitím tohoto enzymu předcházela vzniku biofilmu bakterií *Staphylococcus* nebo *Enterococcus in vitro* [14].

2.3 Struktura a vlastnosti

2.3.1 Struktura

Ve většině bakteriálních biofilmů se nachází více druhů bakterií, proto tvoří velmi komplexní a heterogenní prostředí, které můžeme charakterizovat vysokou fyzikální, chemickou i mikrobiologickou rozmanitostí. S heterogenním prostředím se můžeme ale setkávat také u jednodruhových biofilmů. Buňky stejného druhu totiž mohou zastávat různé funkce. Kolonie tvořené jedním druhem mohou obsahovat více fenotypově odlišných populací, jejichž vlastnosti závisí na daných podmínkách prostředí, které tyto buňky obklopuje, jako například jiné koncentrační gradienty kyslíku, živin nebo iontů. Buňky nacházející se ve svrchní vrstvě biofilmu rostou jako aerobní organismy, protože tyto bakteriální buňky absorbují dostupný kyslík z prostředí, zatímco buňky, které jsou umístěny pod touto vrstvou, rostou anaerobně [15].

Každý bakteriální biofilm tvoří unikátní komunitu, ale některé vlastnosti jsou pro všechny biofilmy společné. Biofilm je tvořen bakteriálními buňkami obklopenými matrix a jednotlivé buňky jsou od sebe odděleny intersticiálními volnými prostory tvořenými kanálky, kterými protéká voda. Díky těmto kanálkům dochází k difuzi živin a kyslíku v rámci kolonie. Biofilmy se navzájem liší v závislosti na tom, tvoří-li biofilm pouze jeden druh bakterií nebo je tvořen směsnými kulturami. Biofilmy, ve kterých se vyskytuje jediný druh, tvoří oproti těm, ve kterých se nachází více druhů, tenčí vrstvy buněk. Například biofilm tvořen čistě bakteriemi druhu *Pseudomonas aeruginosa* mívá tloušťku 30 μm , zatímco biofilmy tvořené druhy *Pseudomonas aeruginosa* a *Klebsiella pneumoniae* jsou silnější, až 40 μm . Tento jev může být způsoben tím, že oba druhy těchto bakterií zvyšují navzájem svou stabilitu [16].

Matrix obklopující bakteriální buňky bývá tvořena extracelulárními polymerními látkami (EPS), převážně sacharidy. Tyto sacharidy mohou tvořit 50–90 % veškerého organického uhlíku biofilmu. Jednotlivé druhy těchto extracelulárních polymerních látek se mohou lišit v chemických i fyzikálních vlastnostech. Některé mohou být neutrální nebo mohou mít také charakter aniontů, například u Gram negativních bakterií. Tento charakter způsobuje přítomnost uronových kyselin nebo pyruvátů spojených ketalovou vazbou. Tato vlastnost je důležitá hlavně pro interakce s kationty, jako jsou vápenaté nebo hořečnaté. Tyto kationty reagují s vlákny polymeru a díky tomu poskytují daleko pevnější vazebnou sílu. U Gram pozitivních bakterií se můžeme naopak setkat s látkami primárně kationtové povahy. V matrix se také nachází velké množství vody, protože látky v ní obsažené jsou vysoce hydratované díky své schopnosti tvořit vodíkové můstky. EPS bývají převážně jak hydrofobní, tak hydrofilní povahy. Bakteriální biofilm nejvíce ovlivňují 2 vlastnosti těchto polymerních látek, jednak složení a struktura polysacharidů, jednak EPS nejsou uniformní a liší se prostorovým uspořádáním. Struktura a složení polysacharidů určuje jejich primární konformaci. Například mnoho těchto látek je tvořeno zbytky hexos, které jsou spojeny buď 1,3- β nebo 1,4- β vazbami a jsou tak pevnější a v některých případech se také málo nebo téměř vůbec nerozpouštějí ve vodě. Ohledně prostorové a časové odlišnosti bylo zjištěno, že různé organismy sice produkují odlišné množství EPS, ale obecně s časem koncentrace EPS v matrix roste [16].

2.3.2 Mezibuněčná komunikace – *quorum sensing*

Mezibuněčná komunikace v rámci biofilmu je především zajišťována pomocí molekul vytvářených bakteriemi, které mohou být přenášeny v rámci biofilmu pomocí difuze. Bakterie rostoucí v biofilmu vylučují signální molekuly, které zvyšují svou koncentraci v závislosti na hustotě výskytu buněk. Proces, při kterém bakterie vylučují tyto molekuly a regulují tak genovou expresi jako odpověď na fluktuace hustoty zastoupení buněk bakteriální populace, se nazývá *quorum sensing* (QS). Odlišná exprese genů způsobuje, že biofilmy tvoří heterogenní prostředí [15]. Obecně lze říci, že QS ovlivňuje geny řídící procesy, které jsou pro bakterii výhodnější, když probíhají synchronizovaně ve více buňkách. Tyto procesy zahrnují bioluminiscenci, tvorbu biofilmu, sekreci nebo sporulaci. Ačkoliv se složky podílející se na regulaci liší, všechny systémy QS jsou založeny na 3 základních principech. Zprvu, všechny buňky tvořící biofilm produkují signální molekuly. K vyvolání odpovědi v rámci biofilmu dochází tehdy, je-li koncentrace signálních molekul dostatečná. Pokud je v rámci biofilmu malý počet buněk, signální molekuly se vyplavují a tak nedochází k jejich detekci a vyvolání odpovědi. Kumulace těchto molekul probíhá pouze tehdy, když se v biofilmu vyskytuje vysoké množství buněk. Dalším společným znakem je přítomnost detektorů signálních molekul v buněčné membráně. Posledním společným principem je, že jakmile dojde k aktivaci genové exprese působením signálních molekul, dochází k dalšímu uvolňování signálních molekul, které jsou potřebné pro spolupráci dalších buněk [17].

V rámci *quorum sensing* rozlišujeme 2 typy komunikace: mezi buňkami jednoho druhu bakterií a mezidruhovou. V prvním případě se setkáváme s mnoha signálními molekulami v závislosti na tom, jedná-li se o Gram pozitivní nebo negativní bakterie [15]. Gram pozitivní bakterie využívají jako signální molekuly peptidy. Pokud je extracelulární koncentrace těchto peptidů vysoká, váží se na receptor histidin kinázu, nacházejícím se v membráně a tím dochází k aktivaci tohoto receptoru a spuštění autofosforylace. U Gram negativních bakterií se jako signální molekuly využívají buď deriváty laktonu homoserinu nebo jiné molekuly, jejichž produkce závisí na S-adenosylmethioninu jako substrátu. Tyto signální molekuly jsou produkovány v buňkách a mohou volně difundovat skrz vnější i vnitřní membrány. Při zvýšené koncentraci těchto látek dochází k vazbě na receptory nacházející se v cytoplazmě, které spouští transkripci [17]. Při mezidruhové komunikaci v rámci biofilmu vystupuje jako signální molekula furanosylborát diester. Tato látka je jediná signální molekula, která není specifická pouze pro jeden druh bakterií [15].

Mezi buňkami tvořícími bakteriální biofilm dochází také ke komunikaci prostřednictvím přenosu plazmidů. Geny, které kódují degradaci cizorodých látek, jsou právě umístěny v plazmidech a díky transportu těchto organel v rámci bakteriálního biofilmu dochází k zvýšení odolnosti jednotlivých buněk [1]. Důvodem, proč dochází ke konjugaci buněk biofilmu častěji než u buněk tvořící pouze mikrokolonie, je s největší pravděpodobností to, že prostředí biofilmu poskytuje minimum smykového působení a bližší kontakt jednotlivých buněk [16].

2.3.3 Resistance biofilmových buněk vůči stresovým podmínkám

Biofilmy jsou daleko odolnější jak vůči fyzikálním vlivům (např. smyková síla způsobená tokem kapaliny), tak vůči chemickým (např. nedostatek živin nebo změny pH), než jsou volné planktonické bakteriální buňky. Dále jsou také rezistentní vůči fagocytóze a fagocyty, které se snaží biofilmy odstranit, mohou navíc způsobit daleko větší škodu na okolní zdravé tkáni než

na biofilmu jako takovém. Díky této odolnosti právě dochází ke vzniku určitých chronických onemocnění. Zatím není přesně známo, proč lze biofilmy poškodit tak obtížně, ale velmi pravděpodobně to souvisí s množstvím pro biofilm specifických vlastností jako pomalý růst a fyziologická odlišnost jednotlivých buněk. Dalším důležitým rysem je složení matrix, která může obsahovat molekuly DNA a dalších polymerů, ale především se skládá z polysacharidů. To, že jsou tyto látky velmi důležité, dokládá vysoká přítomnost genů zapojujících se do syntézy polysacharidů jak v raných tak ve starších stádiích vývoje biofilmu. Kromě ovlivňování agregace a struktury biofilmu se polysacharidy zapojují i do ochrany biofilmu. Způsobují například, že biofilmy jsou odolné vůči smykové síle a fagocytóze zánětlivých buněk. Jsou i důkazy svědčící o tom, že se tyto polysacharidy zapojují do odolnosti vůči antimikrobiálním látkám [18]. Mechanismy odpovědné za rezistenci mohou být jedny z následujících: zpoždění proniknutí antimikrobiálních látek do biofilmu, změna rychlosti růstu organismů v rámci biofilmu nebo jiné fyziologické změny v závislosti na růstu biofilmu [19].

2.3.3.1 Zpoždění průniku antimikrobiálních látek do biofilmu

Aby molekuly antibiotik mohly působit na dané biofilmové buňky, musí difundovat skrz matrix. Díky bariéře, kterou tvoří extracelulární polymerní látky přítomné v matrix, ale dochází k ovlivňování rychlosti transportu molekul antibiotik nebo případně mohou tyto polymerní látky v matrix reagovat s danými antibiotiky. Například při studiu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* bylo zjištěno, že je nutná doba 40 sekund, aby antibiotikum ciprofloxacín proniklo do samostatných buněk a mohlo s nimi reagovat. Tvoří-li ale tato bakterie biofilm, je potřeba až 21 minut. Dále bylo zjištěno, že 2% suspenze alginátu izolovaného z buněk *P. aeruginosa* inhibuje difuzi gentamicinu a tobramycinu. Po použití alginátu lyasy ale k inhibici difuze těchto látek dále nedocházelo [19].

2.3.3.2 Změna rychlosti růstu bakterií v biofilmu

Bakteriální buňky tvořící biofilm rostou daleko pomaleji než volné planktonické buňky. Díky tomuto zpomalenému růstu přijímají také bakterie biofilmu podstatně pomaleji antimikrobiální látky než jednotlivé buňky. Bylo zjištěno, že nejpomaleji rostoucí buňky bakterie *Escherichia coli* v biofilmu jsou nejvíce odolné vůči cetrimidu. Dále bylo zjištěno, že buňky bakterie *P. aeruginosa* tvořící biofilm starý deset dní byly podstatně více odolné vůči tobramycinu a piperacilinu než biofilm starý dva dny. Dávka 500 µg piperacilinu s 5 µg tobramycinu na mililitr úplně inaktivovala jak planktonické buňky, tak buňky dva dny starého biofilmu, zatímco stejná dávka u desetidenního biofilmu snížila počet buněk pouze o 20 %. Podobné výsledky byly získány u dalších bakterií a antimikrobiálních látek [19].

2.3.3.3 Stresová odpověď

Bakteriální biofilmy mají v porovnání s planktonickými buňkami zvýšenou odolnost vůči negativním vlivům prostředí díky vytvoření regulátorů stresové odpovědi. Přínos těchto regulátorů je ale zatím ne zcela objasněn. Jejich role může záviset na podmínkách, v jakých biofilm vzniká nebo na genetické výbavě bakteriálních buněk, což ukazuje na to, že biofilm ve skutečnosti představuje soubor několika rozdílných stádií vývinu bakteriálních buněk [18].

Jako příklad stresových vlivů můžeme uvést oxidativní stres. Schopnost vytvářet biofilmy si vytvořily již archea a bakterie před 3,5 miliardami let. V té době měly jak oceány, tak atmosféra velmi nízký obsah kyslíku. Upravováním metabolismů byly schopné tyto mikroorganismy kumulovat dostupný kyslík ale zároveň také zabránit negativnímu působení

oxidativního stresu. V anaerobním prostředí mikroorganismy produkují reaktivní formy kyslíku (*reactive oxygen species* – ROS) jako vedlejší produkty některých metabolických drah. Molekulární kyslík (O_2) tvoří malé nepolární molekuly, které snadno difundují skrz membrány, ale obtížně reagují s celulárními biomolekulami. Navázáním dalších elektronů na tuto molekulu dochází k vytvoření superoxidu (O_2^-), peroxidu vodíku (H_2O_2) nebo hydroxylových radikálů ($\cdot OH$). Superoxidy sice nereagují s biomolekulami, ale ochotně reagují s další molekulou O_2^- za vytvoření peroxidu vodíku, nebo reagují s oxidem dusnatým za vzniku velmi aktivního oxidantu a reaktivních dusíkatých látek. Jestliže se ROS kumulují v buňkách, dochází k vytváření oxidativního stresu. Vysoké koncentrace těchto molekul mohou poškozovat proteiny, DNA i lipidy, urychlují rychlost mutagenese a dochází k buněčné smrti. Bakterie si proto vyvinuly specifické citlivé senzory, které monitorují rozdílné redoxní signály jako přítomnost nebo nedostatek O_2 , buněčný redoxní stav nebo koncentrace ROS [20].

Oxidativní stres nemusí pocházet pouze z metabolických procesů. Tyto stresové faktory se mohou vyskytovat také v prostředí, ve kterém se biofilm nachází. Pokud jsou buňky vystaveny ionizujícímu (γ) či neionizujícímu (UV) záření, dochází k vytváření ROS v buňkách díky ionizaci intracelulární vody. Dále jako oxidativní stres působí příliš nízká i vysoká teplota, imunitní systém hostitelského organismu, nebo polutanty z prostředí jako kovy nebo chemikálie obsažené v půdě [20].

Jako důkaz o úzké souvislosti mezi oxidativním stresem a tvorbou biofilmu je zapojení stejných regulátorů metabolických dějů v obou dvou procesech. Ovlivnění morfologie biofilmu přítomností ROS můžeme chápat jako důsledek koevoluce biofilmů a kyslíku na Zemi, což mohlo způsobit zapojení ROS jako universálního signálu v mnoha buněčných pochodech zahrnujících i tvorbu bakteriálního biofilmu. Buňky v biofilmu jsou nejen schopny čelit oxidativnímu stresu, ale také využívat ROS jako signál k adaptaci na změny prostředí [20].

Protein, zodpovědný za odpověď organismu na oxidativní stres, OxyR, detekuje H_2O_2 a aktivuje transkripci několika genů zapojených do anti-oxidativní obrany organismu. Vytváří se tak látky, které odstraňují peroxidy nebo například enzymy potlačující geny zodpovědné za vstřebávání železa. Dalším z proteinů regulujících genovou transkripci v závislosti na vystavení oxidativnímu stresu je RpoS. Regulace transkripce daných genů vzniká jako odpověď na pomalý růst buněk jak ve stacionární fázi, tak při působení stresových faktorů. Navíc hraje RpoS nepostradatelnou roli při vytváření biofilmu, protože kontroluje expresi téměř 50% genů, které specificky vyvolávají růst biofilmu. U *P. aeruginosa*, které mají díky mutacím nefunkční QS systém, dochází nejpravděpodobněji k poškození buněk oxidativním stresem. Tyto bakterie využívají QS k podpoře odpovědi na stresové působení a zaměřují se na produkci enzymů, které ničí molekuly ROS [20].

Produkce extracelulárních polymerních látek (EPS) je dalším způsobem, jakým bakterie v rámci biofilmu bojují s oxidativním stresem. Alginát, polysacharid produkovaný bakteriemi *P. aeruginosa*, je například schopen reagovat s hydroxylovými radikály, čímž inhibuje oxidaci lipidů a proteinů. Dále je alginát využíván těmito bakteriemi k reakcím s H_2O_2 , který produkují makrofágy za účelem zničení bakteriálních buněk. Do regulace produkce alginátu se zapojuje více regulátorů, ale mechanismus, jakým regulace probíhá, zatím nebyl objasněn. EPS tedy sice tvoří jak fyzickou, tak chemickou bariéru, tato ochrana je ale pouze krátkodobá.

Předpokládá se ovšem, že pro již přisedlé buňky biofilmu je tato bariéra dostatečná na to, aby se za daný časový úsek byly schopny adaptovat na nové podmínky prostředí [20].

2.3.4 Hydrofobní vlastnosti

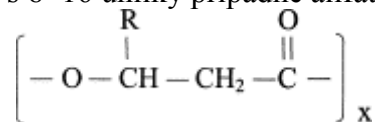
Při tvorbě biofilmu hraje důležitou roli hydrofobicita povrchu bakteriální buňky. Pokud je povrch buňky vysoce hydrofobní umožňuje to bakteriím ulpívat na hydrofobních površích [21]. Hydrofobicita mikrobiálních buněk je určena energií, kterou se přitahují jednotlivé nepolární, případně slabě polárními buňky nacházející se ve vodném prostředí [22].

Schopnost ulpívat tedy na biotických i abiotických površích je závislá na hydrofobních vlastnostech buněk stejně tak jako schopnost pronikat do tkání hostitelských organismů u patogenních bakterií. Mikrobiální populace vytváří ale heterogenní prostředí. Například planktonické buňky v rámci jedné populace se mohou vyskytovat jak hydrofobní, tak hydrofilní, na přichycení k povrchu se ale bude podílet pouze jeden typ těchto buněk. Dále jsou také buňky schopné měnit hydrofobní vlastnosti svého povrchu v závislosti na změnách v prostředí, ve kterém se vyskytují. Gram negativní bakterie, jako je *Pseudomonas putida*, jsou například schopné vytvářet váčky vně membrány, tím dochází k rychlému snižování hydrofobicity povrchu buněk [21].

Kvůli tomu, že materiály implantátů využívané v medicíně mají hydrofobní charakter, může docházet jednoduše k adhezi bakterií na těchto površích a vytváří biofilmů. Jedním z řešení může být použití implantátů, u kterých došlo k úpravě povrchu materiálu, které zabraňují mikroorganismům v ulpívání. Využity mohou být například makromolekuly přírodního původu, jako jsou vlákna fibrinogenu, které snižují hydrofobicitu povrchu implantátů a tím přispívají k inhibici tvorby bakteriálního biofilmu. Tyto látky mohou být například využívány také v tkáňovém inženýrství [21].

2.3.5 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou polyestery různých hydroxyalkanoátů, které jsou mimo jiné vytvářeny jak Gram pozitivními, tak Gram negativními bakteriemi a jsou kumulovány ve vysokém množství až 90 % hmotnosti sušiny. Obecný vzorec molekuly PHA zobrazuje Obrázek 2. Polyhydroxyalkanoáty, které obsahují boční řetězce tvořené hydroxyalkanoáty jako hydroxybutyrát nebo hydroxyvalerát se řadí do skupiny ssc-PHA (short-side-chain PHA). Jako medium-side-chain PHA (msc-PHA) označujeme polyhydroxyalkanoáty, které obsahují jako boční řetězec hydroxyalkanoáty s 6–16 uhlíky případně alifatické uhlíkaté řetězce [23].



Obrázek 2: struktura polyhydroxyalkanoátů [23]

Polyhydroxybutyrát a další polyhydroxyalkanoáty syntetizované bakteriemi jsou biopolymery s vysokou molekulární hmotností a vlastnostmi, které jsou podobné plastům jako je například polypropylen. Polyhydroxybutyrát je jeden z nejlépe popsáných polyhydroxyalkanoátů. Je tvořen monomerem 3-hydroxybutyrátem a může také vytvářet kopolymery s 3-hydroxyvalerátem případně 4-hydroxybutyrátem. Vznikem kopolymeru 3-hydroxybutyrátu a 3-polyhydroxyvalerátu, P(3HB-co-3HV), vzniká biopolymer, který je méně tuhý a elastičtější než je polyhydroxybutyrát [23].

Využití polyhydroxyalkanoátů je velmi podobné jako u běžných plastů, například plastové lahve či kelímky. Na rozdíl od nich jsou ale polyhydroxyalkanoáty biodegradabilní. Jejich biodegradace je závislá na několika faktorech jako je mikrobiální aktivita nebo vlastnosti povrchu, na kterém se nachází, například vlhkost, teplota, pH apod. Degradace PHA probíhá enzymatickou reakcí. Enzym produkovaný mikroorganismy štěpící polyhydroxybutyrát se nazývá PHB depolymeráza a rozkládá tento polymer na jednotlivé hydroxykyseliny [23].

Tvorba PHA je velmi závislá na obsahu živin v daném médiu. Například vysoké množství dusíku způsobuje růst biomasy, ale inhibuje produkci polyhydroxybutyrátu. Dále se na ovlivňování tvorby PHA velmi podílí poměr množství uhlíku a dusíku, kdy bylo například zjištěno, že při poměru C:N 25:1 je produkce polyhydroxyalkanoátů nejvyšší. Tvorba různých druhů PHA je také závislá na typu substrátu. Kopolymer P(3HB-co-3HV) vzniká, pokud je jako substrát použit acetát, kdy tento kopolymer obsahuje vyšší množství hydroxybutyrátu, nebo například propionát, kdy vzniká kopolymer s vyšším obsahem hydroxyvalerátu [24].

V rámci biofilmu polyhydroxyalkanoáty ovlivňují jeho tvorbu a pohyblivost buněk. Například pro bakterii *Pseudomonas extremaustralis*, která je vysoce odolná vůči teplotnímu stresu, bylo zjištěno, že je schopná kumulovat polyhydroxyalkanoáty, pouze pokud je jako zdroj uhlíku použit oktanoát, případně jiné mastné kyseliny, ale ne glukóza. Její růst při nízkých teplotách je umožněn právě díky kumulaci polyhydroxybutyrátu. Porovnáním poměrů množství biofilmových a planktonických buněk s teplotou kultivace 28 °C a 10 °C bylo zjištěno, že poměr těchto typů buněk je podobný při různých teplotách u druhu kultivovaného v médiu za použití oktanoátu, zatím co u druhu, který byl kultivován za použití glukózy jako substrátu, došlo k výraznému úbytku planktonických buněk v médiu. Dále byl pozorován rozdíl v pohyblivosti buněk. U druhu bakterie s možností kumulace PHA, byla pozorována vyšší pohyblivost, než u bakterie kultivované v médiu s obsahem glukózy a tak bez možnosti tvorby PHA [25].

2.4 Specifické metody a techniky pro studium biofilmů

2.4.1 BATH

Adhezi bakteriálních buněk na fázovém rozhraní olej – voda je možné studovat pomocí metody BATH testů (z anglického názvu *bacterial adhesion to hydrocarbons*). Tato jednoduchá metoda je založena na měření adsorpce bakterií před a po smíchání s hydrofobní fází [26]. Před 25 lety byla tato metoda představena jako MATH (z anglického *microbial adhesion to hydrocarbons*). Tento test byl prováděn vortexováním suspenze bakteriálních buněk s roztokem dané hydrofobní fáze. Během vortexování dochází k adhezi bakteriálních buněk k drobným kapkám hydrofobní fáze a tím také k jejich přechodu z hydrofilní fáze. Jednotlivé výsledky z literatury je ale obtížné porovnávat kvůli odlišným hydrofobním fázím, které byly použity, rozdílným pH a také iontové síle. Procentuální adhezi bakteriálních buněk je pak možné vypočítat pomocí následujícího vztahu, kde $OD_{600,t}$ je optická hustota suspenze buněk po smíchání s hydrofobní fází při 600 nm a $OD_{600,0}$ je optická hustota suspenze buněk před smícháním s hydrofobní fází [26]:

$$BATH(\%) = 100 \times \left(1 - \frac{OD_{600,t}}{OD_{600,0}} \right) \quad (1)$$

2.4.2 Studium povrchového napětí

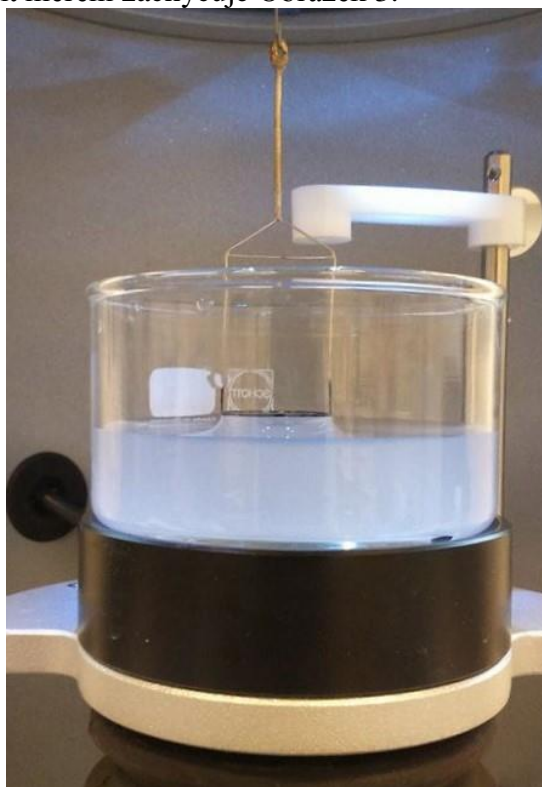
V důsledku působení mezimolekulárních sil v kapalinách, dochází k tomu, že je volná energie minimální, je-li maximální množství molekul plně obklopeno dalšími molekulami této kapaliny [28]. V kapalině tak vzniká vnitřní tlak, který způsobuje, že molekuly na povrchu jsou vtahovány dovnitř a kapalina tak zaujímá nejmenší možný povrch. Síla, která takto působí na molekuly na jednotkové délce fázového rozhraní, se nazývá povrchové napětí. Tato síla působí ve směru ohrazení povrchu kapaliny [29].

Malé kapky kapalin mají sférický tvar, který vzhledem k danému objemu kapičky zaujímá nejmenší plochu. U větších objemů ale dochází k většímu působení vnějších sil na kapalinu, nejčastěji tíhová síla, a dochází k deformaci tohoto tvaru a tím k zploštění kapek [30].

Hodnota povrchového napětí se liší v závislosti na působení například teploty, kdy se zvyšující se teplotou dochází ke snižování povrchového napětí, případně povrchově aktivních látek. Tyto látky se hromadí na povrchu kapaliny, dochází k pozitivní adsorpci, a jejich povrchové napětí je nižší než povrchové napětí dané kapaliny. Molekuly povrchově aktivních látek jsou většinou tvořeny polární a nepolární částí a způsobují také snižování povrchového napětí [29]. Pro měření povrchového napětí se využívá například Du Noüyho kroužek nebo metoda maximálního tlaku v bublině, které jsou popsány níže.

2.4.2.1 Du Noüyho kroužek

Jednou z metod měření povrchového napětí je využití Du Noüyho kroužku. Aparatura se skládá z nádoby, ve které je umístěna studovaná kapalina a kroužku, který je napojen na zařízení měřící sílu. Kroužek je umístěn pod hladinu daného roztoku a zůstává po dobu měření fixován. Nádoba se zatím pohybuje směrem dolů a těsně před tím, než dojde k oddělení kroužku od povrchu je měřena tíha kapaliny, která zůstala navázána na kroužek působením povrchového napětí [31]. Tento moment měření zachycuje Obrázek 3.



Obrázek 3: Du Noüyho kroužek

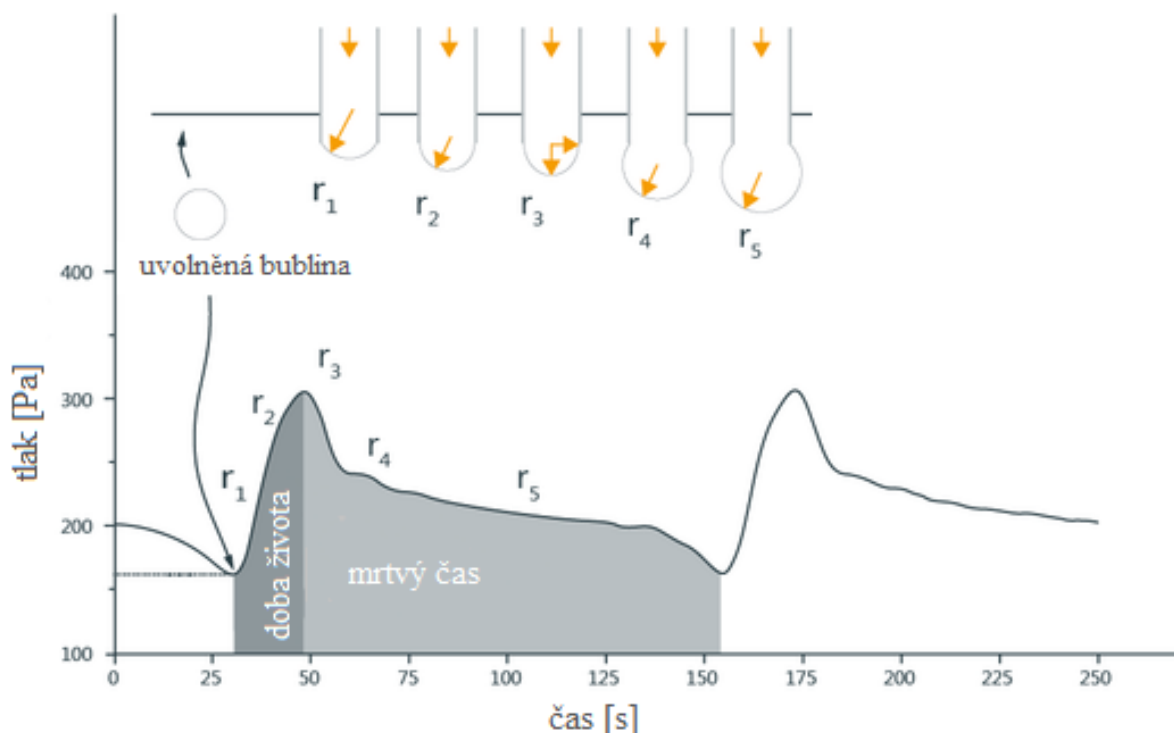
Povrchové napětí je pak přímo úměrné celkové síle působící na kroužek, která je daná následujícím vztahem, kde $W_{\text{kroužek}}$ je tíha kroužku, R je průměr kroužku a γ_{ideal} povrchové napětí [31]:

$$W_{\text{tot}} = W_{\text{kroužek}} + 4\pi R\gamma_{\text{ideal}} \quad (2)$$

Jiným způsobem určování povrchového napětí je stanovování kontinuální síly. Tato metoda nevyžaduje oddělení kroužku od povrchu. Kroužek je opět fixován a dochází k oddalování nádoby s kapalinou, ale jakmile dosáhne síla svého maxima, tak se nádoba vrací zpět a kroužek je více ponořen. Povrchové napětí je pak úměrné této maximální působící síle [31].

2.4.2.2 Metoda maximálního tlaku bubliny

Metoda maximálního tlaku v bublině byla představena roku 1851 jako jeden ze způsobů vhodných pro studium povrchového napětí kapalin. Je to jedna z nejvyužívanějších metod pro měření dynamického povrchového napětí za krátký časový úsek v řádu milisekund až sekund. Výhodou této metody je, že pro své provedení vyžaduje malé množství studovaného roztoku, což je důležité pro studium roztoků biologického původu [32]. Tato metoda je založena na oddělování bubliny, která vzniká na konci kapiláry ponořené do kapaliny [33]. Jednotlivé fáze vzniku bubliny zobrazuje Obrázek 4.



Obrázek 4: fáze tvorby bubliny v závislosti na čase a tlaku [34]

Z grafického znázornění závislosti tlaku na čase vyplývá, že nejvyšší tlak v bublině nastává právě tehdy, když její průměr odpovídá průměru kapiláry [34]. Povrchové napětí pak může být vypočítáno z Laplaceho rovnice, kde r je průměr kapiláry, P tlak a f korekční faktor, který je u kapilár s průměrem větším než 0,1 mm udáván výrobcem daného tenziometru [33]:

$$\gamma = f \frac{r \cdot P}{2} \quad (3)$$

Měření doby života povrchu bubliny je měřen různými způsoby. Některé tenziometry využívají přímého stanovování maximálního tlaku v plynovém zařízení napojeném na kapiláru. Dochází k určení jak doby života povrchu bubliny tak k stanovení mrtvého času ze změny v měřeném tlaku, při měření doby života dochází ke zvyšování tlaku, zatímco u mrtvého času k jeho poklesu [33].

Jedním z odvětví často využívajících metodu maximálního tlaku v bublině je medicína, kdy je tato metoda vhodná jak pro diagnostiku, tak pro monitorování průběhu dané léčby [32].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité bakterie, chemikálie a přístroje

3.1.1 Použité bakterie

V práci byly využity bakterie *Burkholderia cepacia* CCM 2656, které byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně. Dále byl také použit kmen *Burkholderia sacchari* DSM 17165 zakoupený v Leibnitz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Německo.

3.1.2 Použité chemikálie

Minerální olej, Sigma-Aldrich

Hexadekan, Sigma-Aldrich

P(3HB), Sigma-Aldrich

Všechny ostatní použité chemikálie byly čistoty p.a. a vyšší.

3.1.3 Použité přístroje

Biofilmový reaktor CBR 90-3 CDC Biofilm Reactor, BioSurface Technologies

Laminární box Aura mini, BioAir Instruments

Vortex TK3S, Kartell spa

Centrifuga EBA 200, Hettich Zentrifugen

Mikrocentrifuga Sigma 1-14, Sigma Laborzentrifugen

Termostat LS-35

Analytické váhy, Boeco

Temperovaná třepačka Heidolph Unimax 1010, Labicom s.r.o.

Spektrofotometer U – 3900H, Hitachi

Koloidní analyzátor Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd

Bublinový tenziometr BPA-800P, KSV

Tenziometr Sigma 701, KSV

Plynový chromatograf Trace GC Ultra FID detector, Finnigan

Kolona DB-WAX 30 m by 0,25 mm

3.2 Kultivace bakteriálního biofilmu

3.2.1 Příprava inokula

Inokula bakterií *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* byla kultivována v tekutých živných médiích, a to v médiu Nutrient Broth pro bakterii *Burkholderia cepacia* a pro *Burkholderia sacchari* v médiu o složení:

Yeast Extract	0,5 g
Proteose Peptone	0,5 g
Casamino Acids	0,5 g
Glukóza	10 g
Škrob	0,5 g
Pyruvát sodný	0,3 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,05 g
Destilovaná voda	1000 ml

Tekutá média o objemu 50 ml byla připravena do Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml. Následně byla média sterilována v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem po dobu 60 minut.

Dané množství glukózy bylo k médiu pro bakterii *Burkholderia sacchari* napipetováno v laminárním boxu po sterilaci ve formě sterilního roztoku glukózy o koncentraci 20 g/l.

Po sterilaci a ochlazení médií na pokojovou teplotu byly bakterie očkovány v laminárním boxu z kryozkumavek. Připravená inokula byla kultivována 24 hodin na třepačce při 30 °C a 180 rpm.

3.2.2 Kultivace kultur na Petriho miskách

Za účelem tvorby kultur na Petriho miskách i planktonických buněk bylo pro bakterie *Burkholderia cepacia* i *Burkholderia sacchari* připraveno produkční médium o složení:

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,75 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	9,082 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1 g
NH ₄ -Fe(III) citrát	0,06 g
Destilovaná voda	1000 ml

Pro přípravu 100 ml média pro kultivaci planktonických buněk byly použity Erlenmeyerovy baňky o objemu 250 ml. Následně bylo médium sterilováno v tlakovém hrnci po dobu 60 minut s uzavřeným kohoutem.

Po sterilaci a vychladnutí média na pokojovou teplotu bylo v laminárním boxu napipetováno 5 ml sterilního roztoku glukózy o koncentraci 20 g/l, 0,1 ml roztoku stopových prvků a 5 ml inokula. Takto připravené kultury byly kultivovány na třepačce po dobu 72 hodin při teplotě 30 °C a 180 rpm.

Za účelem tvorby kultur na Petriho miskách bylo pro bakterie *Burkholderia cepacia* i *Burkholderia sacchari* připraveno produkční médium o výše uvedeném složení s přídavkem 5 g agaru na 250 ml média a sterilizováno v tlakovém hrnci 60 minut s uzavřeným kohoutem. Po sterilaci bylo v laminárním boxu napipetováno 12,5 ml sterilního roztoku glukózy o koncentraci 20 g/l a 0,25 ml roztoku stopových prvků. Následně bylo médium rozlito do Petriho misek.

Po ztuhnutí média bylo napipetováno 0,1 ml inokula na připravené agarové plotny a rozetřeno sterilní hokejkou. Takto připravené kultury byly kultivovány v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin.

3.2.3 Kultivace bakteriálního biofilmu

Za účelem tvorby biofilmových buněk bylo pro bakterii *Burkholderia cepacia* použito produkční médium o výše uvedeném složení. 250 ml produkčního média bylo spolu s nádobou bioreaktoru sterilizováno v tlakovém hrnci po dobu 60 minut s uzavřeným kohoutem.

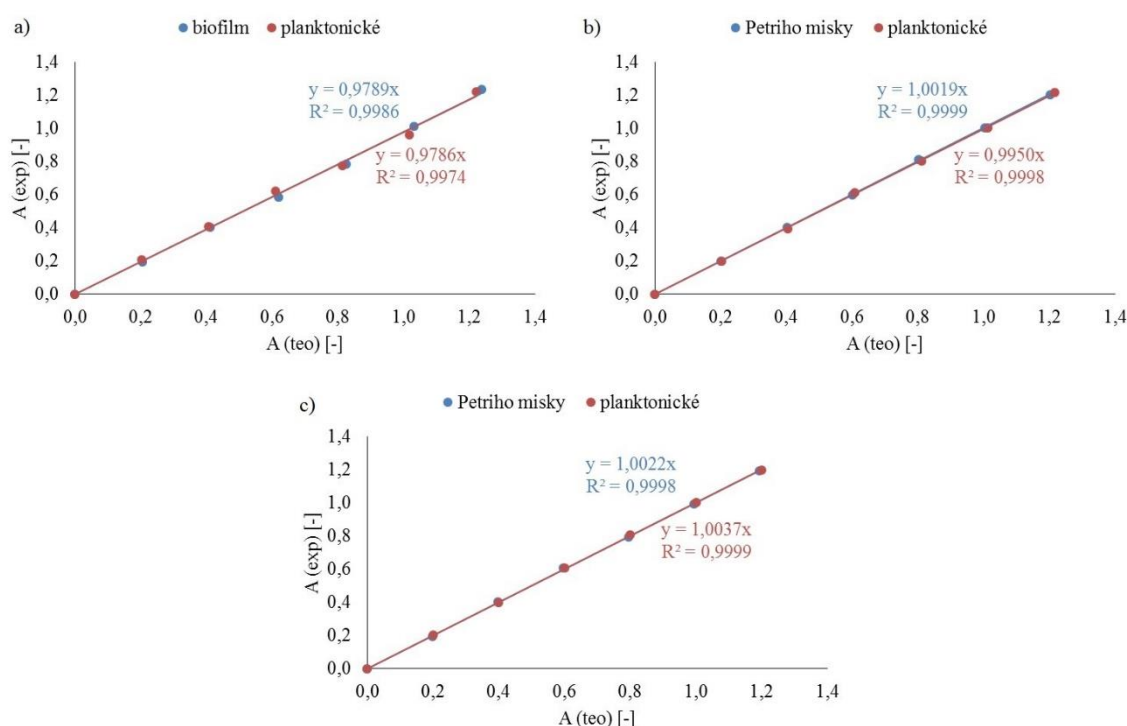
Po sterilaci a vychladnutí na pokojovou teplotu bylo v laminárním boxu do média v bioreaktoru napipetováno 12,5 ml sterilního roztoku glukózy o koncentraci 20 g/l, 0,25 ml roztoku stopových prvků a 12,5 ml inokula. Takto připravené kultury byly kultivovány po dobu 6 dní při teplotě 30 °C a otáčkách míchadla 180 rpm.

3.3 Provedení BATH testů

Vzorky pro realizaci BATH testů byly z planktonických buněk připraveny odpipetováním potřebného množství roztoku z tekutého média a buňky byly rozsuspendovány v destilované vodě. Vzorky buněk kultur z Petriho misek byly odebrány kličkou z pevného média a také

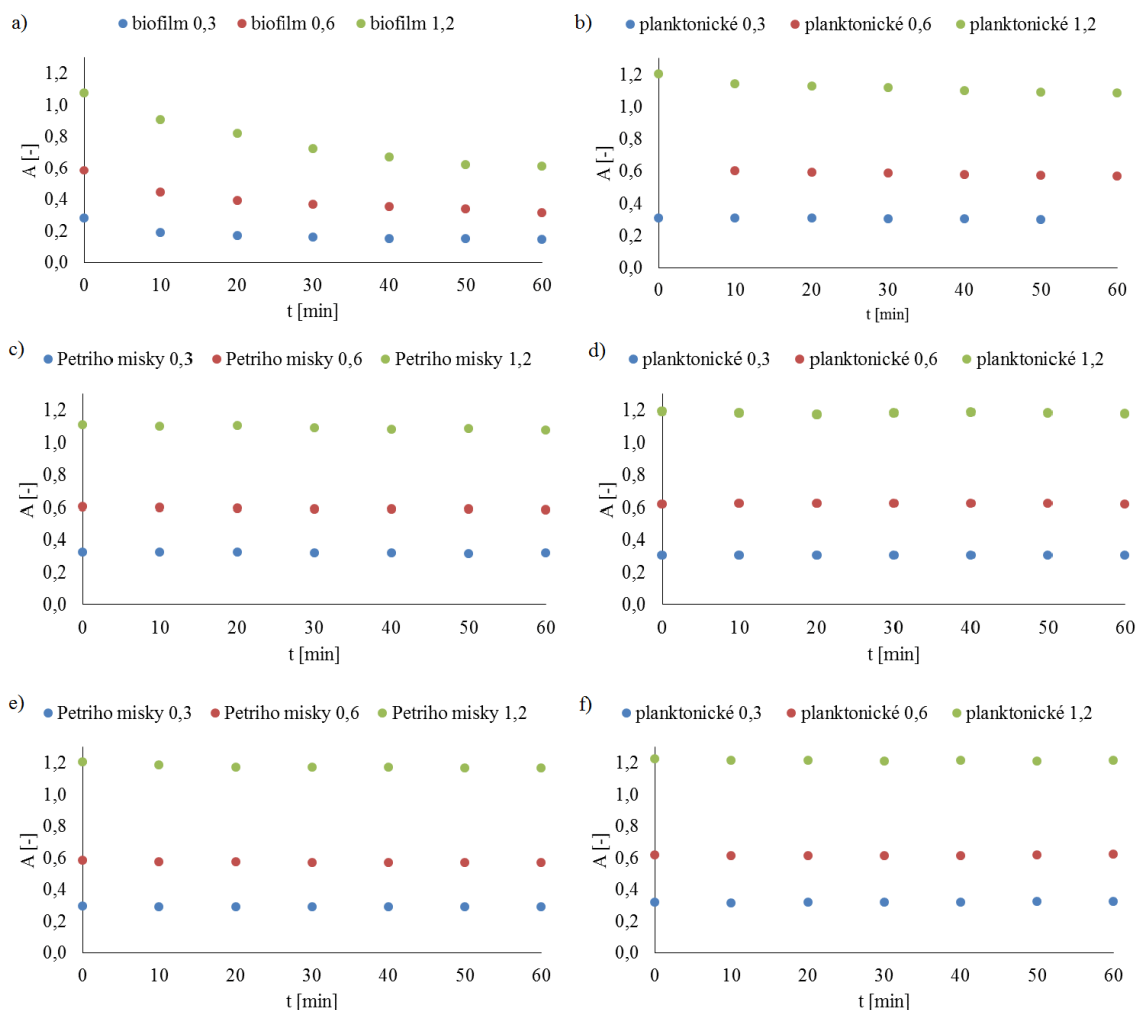
rozsuspendovány v destilované vodě. Vzorky bakteriálního biofilmu byly připraveny odebráním biofilmových buněk a rozsuspendováním v 1 ml destilované vody. Tyto buňky byly následně dvakrát odstředovány po dobu 5 minut při otáčkách 5000 rpm.

Pro vlastní stanovení adheze bakteriálních buněk bylo prvně určeno, jestli je absorbance roztoku úměrná koncentraci bakteriálních buněk ve vzorku. Jednotlivé vzorky byly připraveny ředěním zásobního roztoku o absorbanci 1,2 při vlnové délce 600 nm. Pro všechny vzorky byla spočítána teoretická hodnota absorbance na základě použitého ředění a také změřena experimentálně hodnota absorbance jednotlivých roztoků. Vynesení grafické závislosti experimentálních hodnot na teoretických, viz Obrázek 5, byla získána křivka. Koeficienty spolehlivosti daných křivek jak pro kultury z Petriho misek, tak pro biofilmové a planktonické buňky bakterií *Burkholderia cepacia* i *Burkholderia sacchari* mají vysokou hodnotu. Absorbanci suspenze bakteriálních buněk je tedy možné považovat za úměrnou koncentraci těchto buněk ve vzorku.



Obrázek 5: grafické závislosti experimentálních hodnot absorbance na teoretických pro a) biofilm *Burkholderia cepacia*, b) kultury z Petriho misek *Burkholderia cepacia*, c) kultury z Petriho misek *Burkholderia sacchari*

Dále bylo stanoveno, jestli bakteriální buňky ve vzorku sedimentují, a pokud ano, jakou rychlostí. Rychlá sedimentace buněk by ovlivňovala hodnotu absorbance jednotlivých roztoků a docházelo by tak k chybám při stanovení množství buněk v roztoku. Rychlost sedimentace byla měřena pro vzorky jak planktonických, tak biofilmových buněk bakterie *Burkholderia cepacia* i *Burkholderia sacchari* a to po dobu jedné hodiny u roztoků o různých počátečních absorbancích. Z grafických závislostí absorbance na čase, Obrázek 6, vyplývá, že buňky kultur z Petriho misek ani planktonické buňky významně nesedimentují, takže nedochází k ovlivnění hodnoty absorbance, zatímco u biofilmových buněk, viz Obrázek 6 a), dochází k výrazné sedimentaci a hodnota absorbance je tak ovlivňována rychlostí měření. Proto je nutné u tohoto typu buněk provést měření ihned po odebrání vzorku.



Obrázek 6: sedimentace buněk biofilmu *Burkholderia cepacia* a) biofilmové, b) planktonické, kultur z Petriho misek *Burkholderia cepacia* c) z misek, d) planktonické a kultur z Petriho misek *Burkholderia sacchari* e) z misek, f) planktonické

Pro vlastní experiment byly připraveny roztoky ředěním zásobního roztoku o počáteční optické hustotě 1,2 při vlnové délce 600 nm. U takto připravených vzorků byla změřena absorbance při vlnové délce 600 nm. Následně byl vodný roztok v poměru 1:1 smíchán s hydrofobní fází a vortexován po dobu 2 minut. Poté byla emulze ponechána v klidu po dobu 15 minut. Pomocí injekční stříkačky byla následně odebrána spodní vodná fáze a proměřena absorbance této fáze. Rozdíl v koncentraci buněk ve vodné fázi před a po smíchání s hydrofobní fází bylo možné pozorovat i vizuálně, viz Obrázek 7.



Obrázek 7: srovnání roztoků vzorků po přidání hydrofobní fáze, po vortexování a po odstátí

U připravených roztoků byl také stanoven Zeta potenciál, popisující stabilitu dané soustavy, a střední hodnota objemové distribuce, popisující velikost částic. Hodnota Volume mean, objemová distribuce, je určována s předpokladem výskytu kulovitých částic ve vzorku. Bakterie *Burkholderia cepacia* i *Burkholderia sacchari* mají ale protáhlý, tyčinkový tvar a mohlo tak docházet k mírnému ovlivnění měřených hodnot.

3.4 Měření povrchového napětí

Pro měření povrchového napětí suspenze kultur z Petriho misek i planktonických buněk jak metodou využívající Du Noüyho kroužek, tak metodu maximálního tlaku bubliny byly připraveny vzorky stejným způsobem jako pro provedení BATH testů. Z takto získaných vzorků bylo připraveno 25 ml roztoků o počátečních optických hustotách 0,3; 0,6 a 1,2. Bakteriální biofilm nebyl pro toto měření použit, protože nebylo možné nakultivovat nezbytné množství biofilmových buněk.

3.5 Stanovení PHA

3.5.1 Příprava kalibračních roztoků

Roztoky pro kalibrační řadu byly připraveny ředěním zásobního roztoku obsahujícího navážku PHB a 4 ml chloroformu, který byl po dobu 20 minut umístěn do termostatu o teplotě 70 °C. Standardy byly napipetovány do vialek tak, aby po doplnění chloroformem na objem 1 ml tvořili kalibrační řadu o koncentracích 0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1 mg/ml. K takto připraveným roztokům bylo napipetováno 0,8 ml 15% kyseliny sírové v methanolu a vialky byly uzavřeny. Ty byly následně umístěny do termostatu po dobu 3 hodin při teplotě 94 °C pro esterifikaci a po jejím ukončení byly jednotlivé roztoky extrahovány v 0,5 ml 0,05 mol/dm³ roztoku NaOH. Následně bylo pro analýzu do nových vialek odpipetováno 50 µl chloroformové fáze a přidáno 950 µl chloroformu.

3.5.2 Příprava vzorků

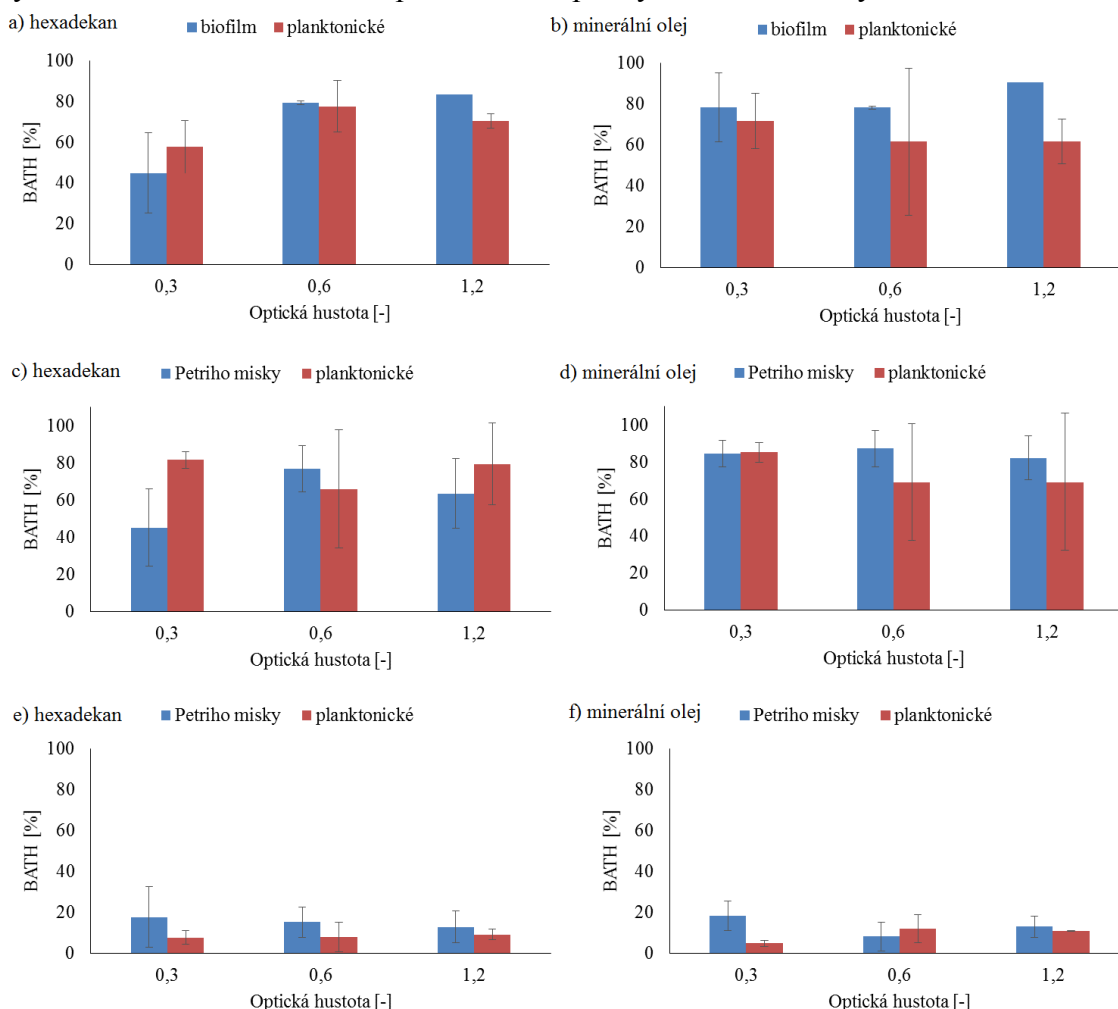
Pro stanovení polyhydroxyalkanoátů v biofilmových buňkách i kulturách z Petriho misek byly odebrané buňky rozsuspendovány v 1 ml destilované vody a dvakrát centrifugovány při otáčkách 5000 rpm po dobu 5 minut. Vzorky planktonických buněk byly připraveny odebráním 10 ml suspenze buněk a opět byla dvakrát provedena centrifugace při otáčkách 5000 rpm po dobu 5 minut. Po slití druhého supernatantu byly buňky umístěny do termostatu pro vysušení do konstantní hmotnosti.

Po vysušení bylo do vialiek odváženo s přesností na 0,1 mg 10 mg biomasy. Dále byl k navážce napipetován 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15% kyseliny sírové v methanolu. Po uzavření byly vialky umístěny do termostatu po dobu 3 hodin při 94 °C pro esterifikaci a po jejím ukončení byly jednotlivé roztoky extrahovány v 0,5 ml 0,05 mol/dm³ roztoku NaOH. Následně bylo pro analýzu do nových vialiek odpipetováno 50 µl chloroformové fáze a přidáno 950 µl chloroformu.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 BATH testy

Pro srovnání hydrofobních vlastností buněk planktonických, které byly odebrány z bioreaktoru i kultivovány v Erlenmeyerových baňkách, biofilmových buněk a kulturách z Petriho misek byly použity BATH testy. Dále byl také srovnáván vliv použití různých typů hydrofobních fází, a to minerálního oleje a hexadekanu. Pro vyhodnocení rozdílů těchto vlastností byly vyneseny grafické závislosti procentuálního množství buněk, které přešly do hydrofobní fáze, na hodnotách počátečních optických hustot měřených vzorků, viz Obrázek 8.



Obrázek 8: grafická závislost množství buněk přešlých do hydrofobní fáze u biofilmu *Burkholderia cepacia* a) hexadekan, b) minerální olej, u kultur z Petriho misek *Burkholderia cepacia* c) hexadekan, d) minerální olej a u kultur z Petriho misek *Burkholderia sacchari* e) hexadekan, f) minerální olej

Množství buněk, které se naadsorbovaly na fázové rozhraní, případně přešly do hydrofobní fáze, jsou vysoká pro obě použité hydrofobní fáze všech použitých počátečních optických hustot biofilmu i kultur z Petriho misek *Burkholderia cepacia*. U kultur z Petriho misek *Burkholderia sacchari* jsou tyto hodnoty velmi nízké v porovnání s prvně zmiňovanou bakterií.

Biofilmové buňky *Burkholderia cepacia* přecházejí do hydrofobní fáze ochotněji než buňky planktonické při použití jak hexadekanu, tak minerálního oleje. Hodnoty procentuálního přestupu biofilmových buněk se pohybovaly v rozmezí 44,94–90,54 % zatímco

u planktonických 57,91–77,75 %. U biofilmových buněk nebylo opakováno měření počáteční optické hustoty 1,2 z důvodu nedostatku biofilmových buněk.

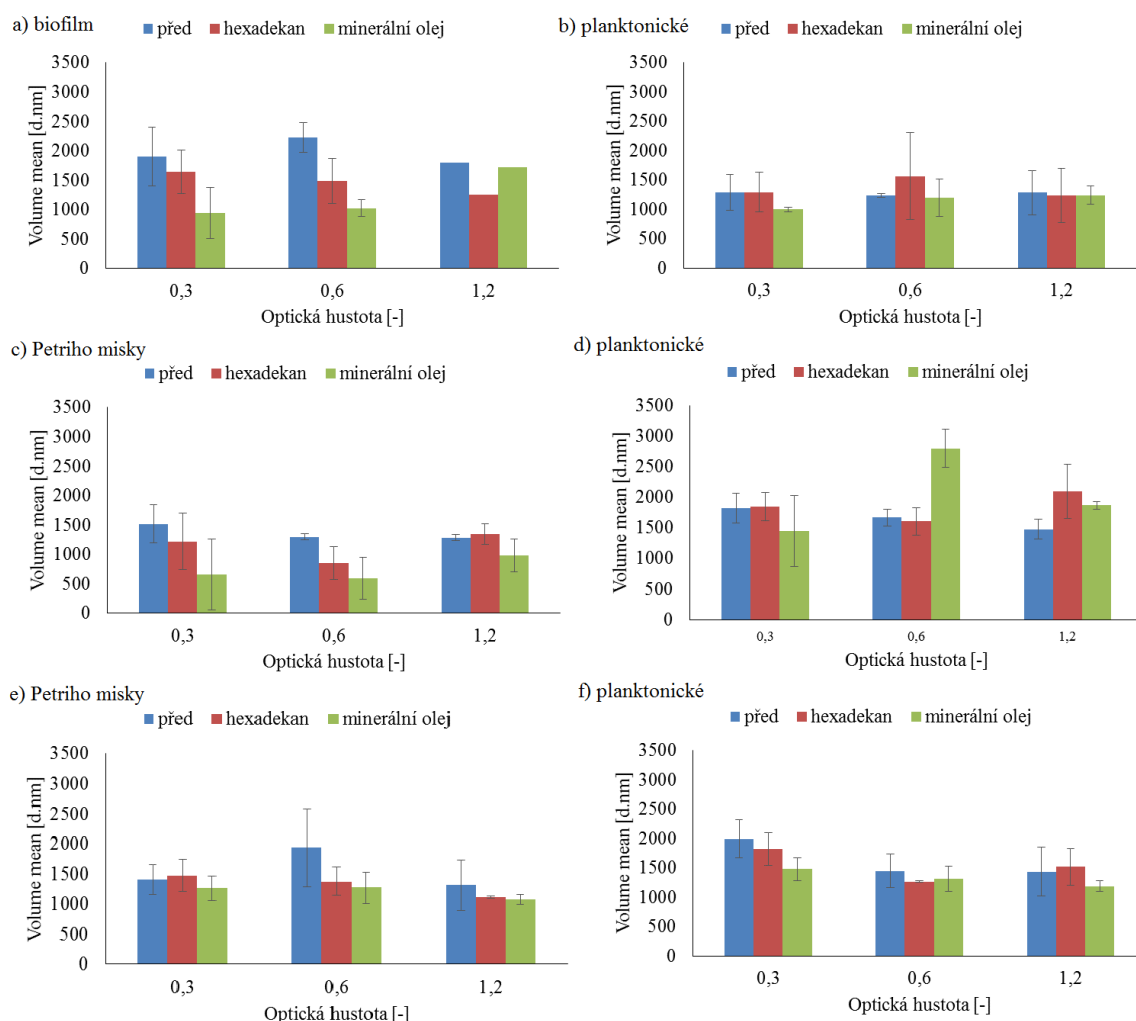
U kultur z Petriho misek bakterie *Burkholderia cepacia* při smíchání s hexadekanem přecházely do hydrofobní fáze planktonické buňky ochotněji než buňky kultur odebraných z misek. U buněk odebraných z kultur z misek byl naměřen procentuální přestup množství buněk 45,22–76,66 %, u buněk planktonických pak 66,00–81,57 %. Při použití minerálního oleje, jako hydrofobní fáze, docházelo ale ochotněji k přestupu buněk kultur z misek než buněk planktonických. Hodnoty u buněk kultur z misek se pohybovaly v rozmezí 60,15–87,24 % zatímco u planktonických buněk 69,09–85,27 %.

U kultur z misek bakterie *Burkholderia sacchari* přecházely při použití jak hexadekanu, tak minerálního oleje přecházely ochotněji do hydrofobní fáze buňky z kultur z misek než buňky planktonické. Pro kultury z misek se hodnoty pohybovaly v intervalu 8,13–18,38 % zatímco u planktonických buněk 4,93–12,05 %.

Rozdíl v množství buněk, které přešly do hydrofobní fáze, u bakterií *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* může být vysvětlen tím, že prvně zmiňovaná bakterie vytváří bakteriální biofilm snadněji a tvorba tohoto biofilmu je i dobře popsána. Vyšší afinita biofilmových buněk k hydrofobní fázi odpovídá také tomu, že se bakteriální biofilmy vytváří převážně na hydrofobních površích, jak je popsáno v odstavci 2.2.1.1. *Burkholderia sacchari* na druhou stranu vytváří biofilm pouze v malém množství. Toto množství nebylo dostačující pro přípravu vzorků, a proto nebylo také pro biofilm této bakterie provedeno měření.

Více hydrofobní vlastnosti biofilmových buněk může způsobovat to, že jsou tyto buňky na rozdíl od planktonických již upevněny k hydrofobnímu povrchu a vytváří tak přisedlou životní formu. Čím více hydrofobní vlastnosti budou dané buňky mít, tím snadněji budou na hydrofobním povrchu ulpívat a snadněji se také na tomto povrchu udržet. Rozdílné chování buněk kultur z Petriho misek a biofilmových buněk *Burkholderia cepacia* může být vysvětleno odlišným způsobem kultivace těchto typů buněk. U biofilmu dochází navíc k vytváření extracelulární matrix, která se může podílet na hydrofobních vlastnostech daných buněk, na rozdíl od kultur z Petriho misek.

Dále byla pomocí DLS, viz odstavec 3.3, u vzorků připravených smícháním s hydrofobní fází sledována velikost buněk, které zůstaly ve vodné fázi a porovnávána s velikostí buněk obsažených ve vzorku před smícháním s hydrofobní fází u všech studovaných kultur. Pro srovnání jednotlivých hodnot byla vynesena grafická závislost veličiny Volume mean na počáteční optické hustotě u jednotlivých typů vzorků, viz Obrázek 9.



Obrázek 9: velikost buněk nacházejících se v počáteční suspenzi a po smíchání s hexadekanem či minerálním olejem pro biofilm *Burkholderia cepacia* a) biofilmové, b) planktonické, kultury z Petriho misek *Burkholderia cepacia* c) z misek, d) planktonické a kultury z Petriho misek *Burkholderia sacchari* e) z misek, f) planktonické

Z grafických závislostí lze pozorovat u biofilmových buněk a buněk odebraných z Petriho misek obou bakterií trend postupného zmenšování velikosti buněk v pořadí před smícháním s hydrofobní fází, po smíchání s hexadekanem a nejmenší buňky se nacházely ve vzorcích vzniklých smícháním s minerálním olejem. U planktonických buněk obou bakterií i typů kultur se obdobný trend nevyskytoval.

U biofilmu *Burkholderia cepacia* měly biofilmové buňky větší velikost než u buněk planktonických. Hodnota Volume mean pro biofilmové buňky *Burkholderia cepacia* ve vodné fázi se pohybovaly v rozmezí 1804,33–2228,67 d·nm, po smíchání s hexadekanem jako hydrofobní fází 1252,33–1638,17 d·nm a po smíchání s minerálním olejem 939,17–1716,67 d·nm. U planktonických buněk této kultury pak ve vodné fázi před smícháním byly naměřeny hodnoty 1235,17–1288,40 d·nm, po smíchání s hexadekanem 1237,55–1568,67 d·nm a s minerálním olejem 1000,12–1240,4 d·nm.

Pro kultury z Petriho misek *Burkholderia cepacia* bylo zjištěno, že buňky odebrané z Petriho misek byly mírně menší než buňky planktonické. Před smícháním s hydrofobní fází se hodnota Volume mean pro buňky odebrané z kultur Petriho misek pohybovala v intervalu

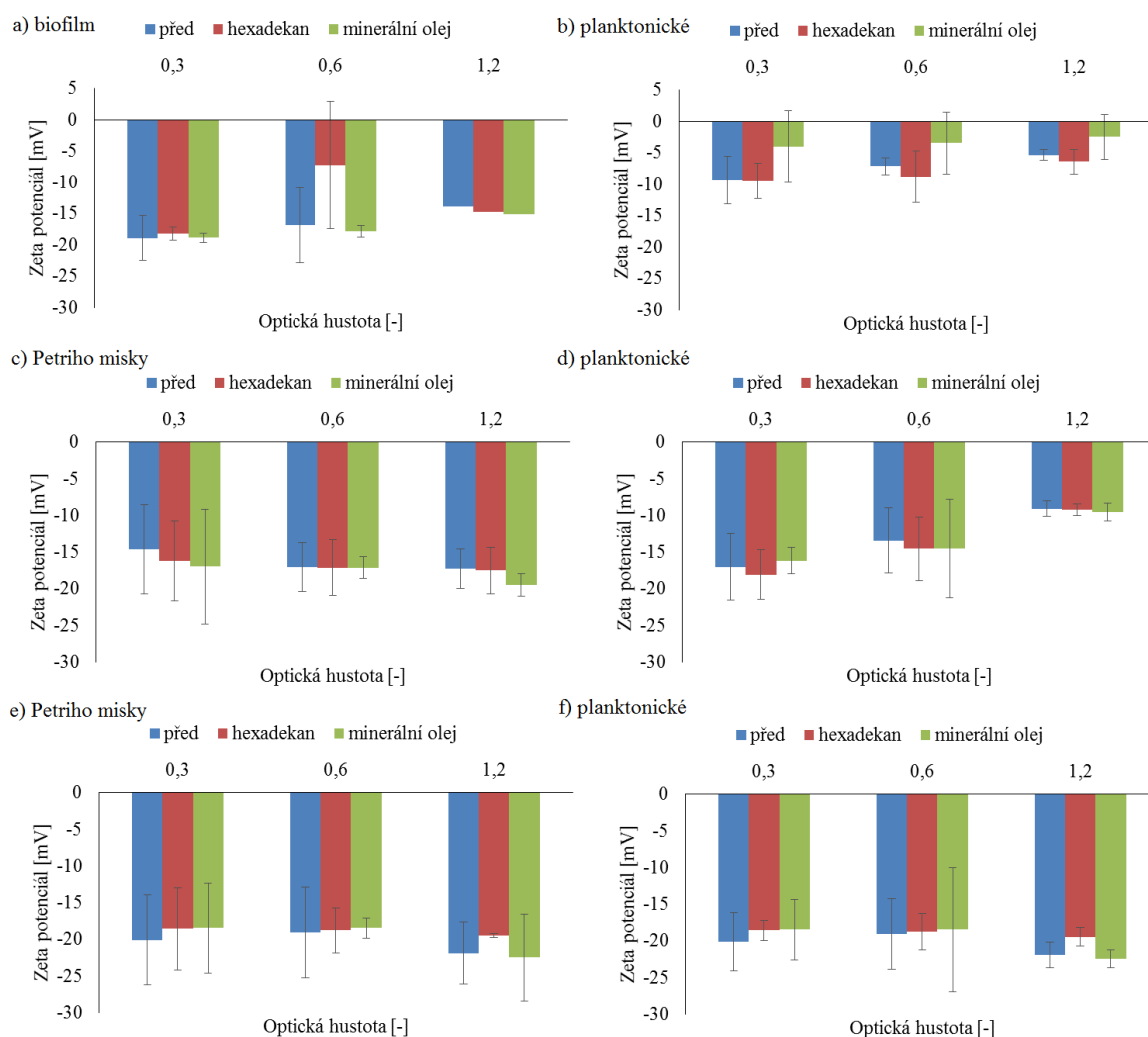
1286,33–1519,78 d·nm, po smíchání s hexadekanem 854,66–1341,67 d·nm a s minerálním olejem 587,52–981,79 d·nm. U planktonických buněk byly ale před smícháním s hydrofobní fází naměřeny hodnoty 1477,33–1821,00 d·nm, po smíchání s hexadekanem 1609,33–2101,44 d·nm a s minerálním olejem 1450,19–2799,78 d·nm.

U kultur *Burkholderia sacchari* také kultivovaných na Petriho miskách se ale rozdíly ve velikosti buněk odebraných z misek a planktonických téměř nevyskytovaly. Pro buňky z Petriho misek byly stanoveny hodnoty Volume mean v intervalu 1313,78–1937,00 d·nm, po smíchání s hexadekanem 1108,67–1472,67 d·nm a po smíchání s minerálním olejem 1074,02–1278,67 d·nm. U planktonických buněk byly pak naměřeny hodnoty před smícháním s hydrofobní fází v rozmezí 1450,00–1996,89 d·nm, po smíchání s hexadekanem 1266,22–1819,67 d·nm a s minerálním olejem 1189,56–1481,67 d·nm.

Rozdíl ve velikosti buněk biofilmu a planktonických *Burkholderia cepacia* mohl být způsoben odlišným způsobem růstu těchto typů buněk. U přisedlých biofilmových buněk dochází k vytváření více vrstev buněk v průběhu tvorby biofilmu a dále mohla ovlivnit stanovenou velikost buněk také přítomnost extracelulární matrix, která ulpěla na bakteriálních buňkách. Rozdíl ve velikosti buněk je patrný také porovnáním biofilmových buněk a buněk kultur z Petriho misek *Burkholderia cepacia*. Maximální hodnota Volume mean pro biofilmové buňky byla o přibližně 700 d·nm vyšší než maximální hodnota pro buňky odebrané z kultur misek. To mohlo být způsobeno odlišným způsobem a také odlišnou dobou kultivace. Bakteriální biofilm byl kultivován po dobu 6 dní, zatímco kultury na Petriho miskách byly kultivovány jen po dobu 3 dnů. Rozdíl v naměřené velikosti buněk mohl být způsoben také přítomností extracelulární matrix u biofilmových buněk. Velikost biofilmových buněk, případně přítomnost extracelulární matrix, mohla také ovlivňovat jejich sedimentaci, kterou popisuje Obrázek 6. Biofilmové buňky *Burkholderia cepacia* měly ze všech studovaných typů buněk největší velikost a sedimentace také probíhala pouze u nich. U kultur z Petriho misek bakterií *Burkholderia cepacia* i *Burkholderia sacchari* nebyl pozorován výrazný rozdíl ve velikosti buněk.

To, že u planktonických buněk nelze pozorovat obdobnou závislost zmenšování velikosti buněk ve vzorcích v pořadí před smícháním s hydrofobní fází, po smíchání s hexadekanem a po smíchání s minerálním olejem, je možné vysvětlit tím, že planktonické buňky tvoří nesourodý systém a vlastnosti jednotlivých buněk nejsou záměrně koordinovaně ovlivňovány tak, jak tomu je v buňkách bakteriálního biofilmu. U planktonických buněk je ale možné pozorovat rozdíl ve velikosti u buněk *Burkholderia cepacia* kultivovaných v bioreaktoru po dobu 6 dní a buněk kultivovaných v Erlenmeyerových baňkách po dobu 3 dnů *Burkholderia cepacia* i *Burkholderia sacchari*. Hodnota volume mean pro planktonické buňky kultivované kratší dobu byla přibližně o 700 d·nm vyšší. Tento rozdíl mohla způsobovat odlišná doba kultivace, kdy planktonické buňky odebrané z bioreaktoru mohly být vystaveny stresovým podmínkám z ubývajících množství živin, případně mohly být tyto odebrané buňky již nově uvolněné bakteriálním biofilmem po ukončení fáze zrání.

Následně byl u připravených vzorků porovnáván také Zeta potenciál stejným způsobem jako u velikosti přítomných buněk, viz odstavec 3.3. Pro srovnání jednotlivých hodnot byla vynesena grafická závislost Zeta potenciálu na počáteční optické hustotě u jednotlivých typů vzorků, Obrázek 10.



Obrázek 10: Zeta potenciál buněk nacházejících se v počáteční suspenzi a po smíchání s hexadekanem či minerálním olejem pro biofilm *Burkholderia cepacia* a) biofilmové, b) planktonické, kultury z Petriho misek *Burkholderia cepacia* c) z misek, d) planktonické a kultury z Petriho misek *Burkholderia sacchari* e) z misek, f) planktonické

V těchto grafických závislostech nelze pozorovat pravidelnou závislost hodnoty Zeta potenciálu na počáteční optické hustotě ani na způsobu přípravy vzorku pro oba typy kultur i bakterií. Pro všechny tyto typy buněk ale nabýval Zeta potenciál obdobných záporných hodnot, pouze u planktonických buněk *Burkholderia cepacia* odebraných z bioreaktoru pak byly v porovnání s ostatními typy buněk hodnoty vyšší.

Pro biofilmové *Burkholderia cepacia* byl naměřen Zeta potenciál v rozmezí $(-18,92) - (-7,26)$ mV, pro planktonické pak $(-9,43) - (-2,50)$ mV. U kultur z Petriho misek této bakterie se pak hodnoty pohybovaly v rozmezí $(-19,50) - (-14,62)$ mV pro buňky odebrané z misek a $(-18,08) - (-9,08)$ mV u buněk planktonických. Kultury z Petriho misek *Burkholderia sacchari* nabývaly hodnot Zeta potenciálu mírně nižších než u *Burkholderia cepacia* kultivované stejným způsobem a to $(-22,49) - (-18,48)$ mV pro buňky odebrané z Petriho misek a pro buňky planktonické $(-30,47) - (-17,28)$ mV.

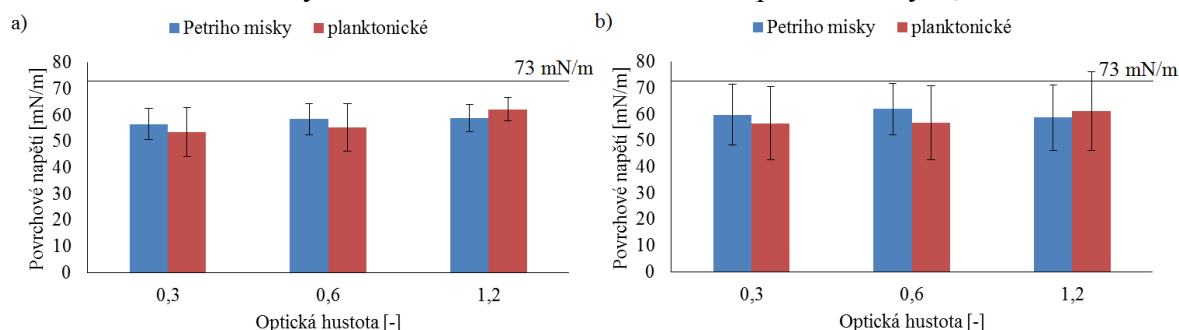
Všechny naměřené hodnoty se pohybovaly v intervalu $-30 - 30$ mV. Soustavy se Zeta potenciálem nabývajících těchto hodnot nejsou koloidně stabilní a mají tendenci agregovat.

Buňky obou druhů bakterií se tedy budou shlukovat a mohou se tedy vytvářet mikrokolonie a následně i biofilmy. Kvůli tomu, že rozdíly v naměřených hodnotách Zeta potenciálu všech vzorků jsou ale natolik malé a mezi hodnotami se nenachází pravidelný trend, je možné říci, že životní styl buněk (planktonický nebo biofilmový) nemá výrazný vliv na hodnotu Zeta potenciálu.

4.2 Povrchové napětí

4.2.1 Du Noüyho kroužek

Pro porovnání vlivu přítomnosti bakterií *Burkholderia cepacia* i *Burkholderia sacchari* na povrchové napětí vody byla použita tenziometrie využívající Du Noüyho kroužek. Vzorky pro tuto analýzu byly připraveny stejným způsobem jako pro provedené BATH testů, ale povrchové napětí bylo měřeno pouze pro vzorky před smícháním s hydrofobní fází. Následně byla vynesena grafická závislost povrchového napětí na počáteční optické hustotě pro porovnání chování buněk odebraných z kultur Petriho misek a buněk planktonických, viz Obrázek 11.



Obrázek 11: vliv buněk kultur z Petriho misek na povrchové napětí vody a) *Burkholderia cepacia*, b) *Burkholderia sacchari*, v porovnání s tabelovanou hodnotou povrchového napětí vody [35]

U obou typů buněk i bakterií docházelo k mírnému snížení povrchového napětí suspenze buněk, v porovnání s tabelovanou hodnotou povrchového napětí pro vodu. Pro planktonické pak bylo snížení této hodnoty výraznější. Mezi studovanými vzorky nedocházelo k výraznému ovlivňování povrchového napětí v závislosti na počáteční optické hustotě.

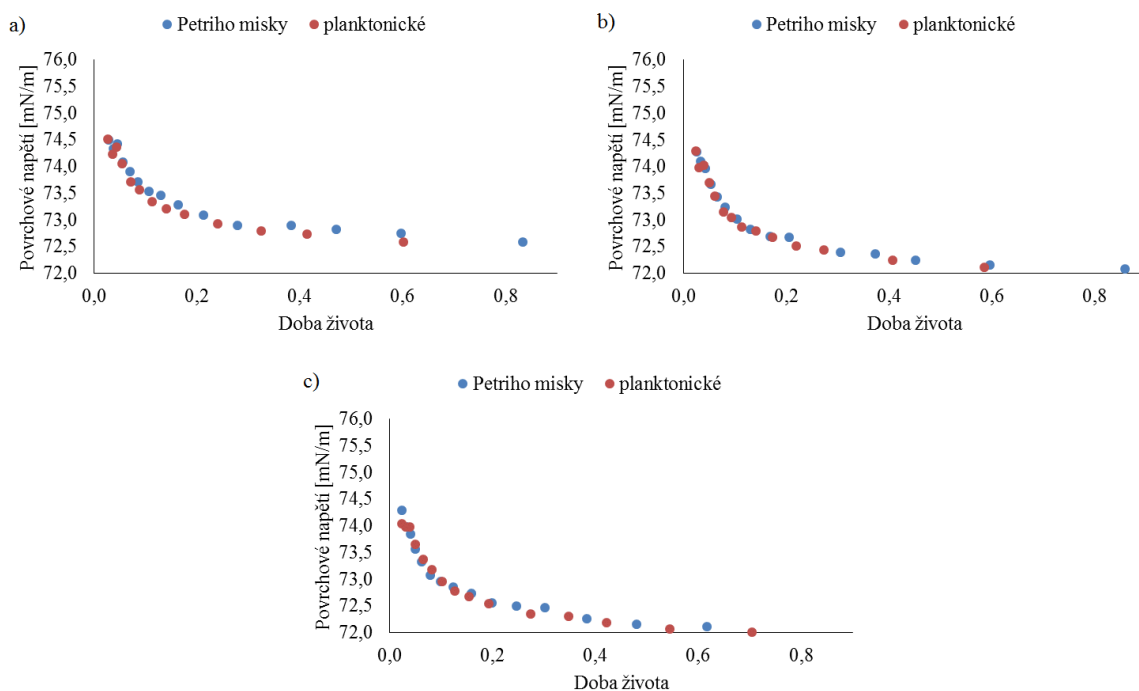
Pro buňky odebrané z kultur Petriho misek *Burkholderia cepacia* se naměřené hodnoty povrchového napětí pohybovaly v rozmezí 58,499–58,809 mN/m, pro buňky planktonické pak 53,409–62,201 mN/m. Pro bakterii *Burkholderia sacchari* kultivovanou na Petriho miskách byly naměřeny hodnoty 58,776–61,968 mN/m a pro planktonické buňky se hodnoty povrchového napětí pohybovaly v intervalu 56,593–61,220 mN/m.

U planktonických buněk obou druhů bakterií dochází k vyššímu ovlivnění povrchového napětí suspenze, to je způsobeno tím, že byly tyto buňky více přitahovány na fázové rozhraní vzhledem k jejich pohyblivosti a hydrofobní povaze, která se projevuje především u bakterie *Burkholderia cepacia* jak bylo zjištěno pomocí BATH testů. Ovlivnění povrchového napětí vody přítomností bakterií ale nebylo příliš výrazné ani u jednoho typu buněk, což mohlo být způsobeno nízkým množstvím buněk v dané suspenzi. U vzorků s vyšší počáteční optickou hustotou je pravděpodobné, že by vliv přítomnosti buněk byl vyšší.

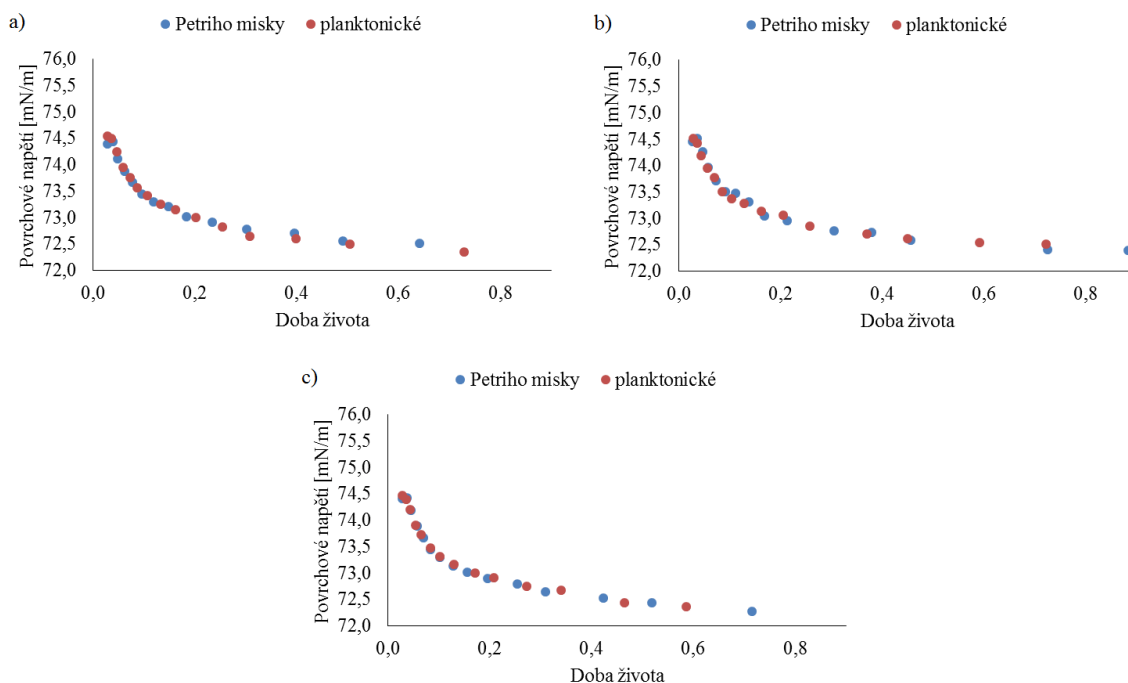
4.2.2 Metoda maximálního tlaku bubliny

Vliv přítomnosti bakteriálních buněk na povrchové napětí vody byl následně studován také pomocí tenziometrie využívající principu měření maximálního tlaku bubliny. Porovnávány

byly opět vzorky s počáteční optickou hustotou 0,3; 0,6 a 1,2 kultur z Petriho misek bakterií *Burkholderia cepacia* i *Burkholderia sacchari*. Pro srovnání jednotlivých typů buněk byla vynesena grafická závislost povrchového napětí na době života bubliny, viz Obrázek 12 a Obrázek 13.



Obrázek 12: závislost povrchového napětí suspenze buněk kultur *Burkholderia cepacia* z Petriho misek pro počáteční optické hustoty a) 0,3; b) 0,6; c) 1,2

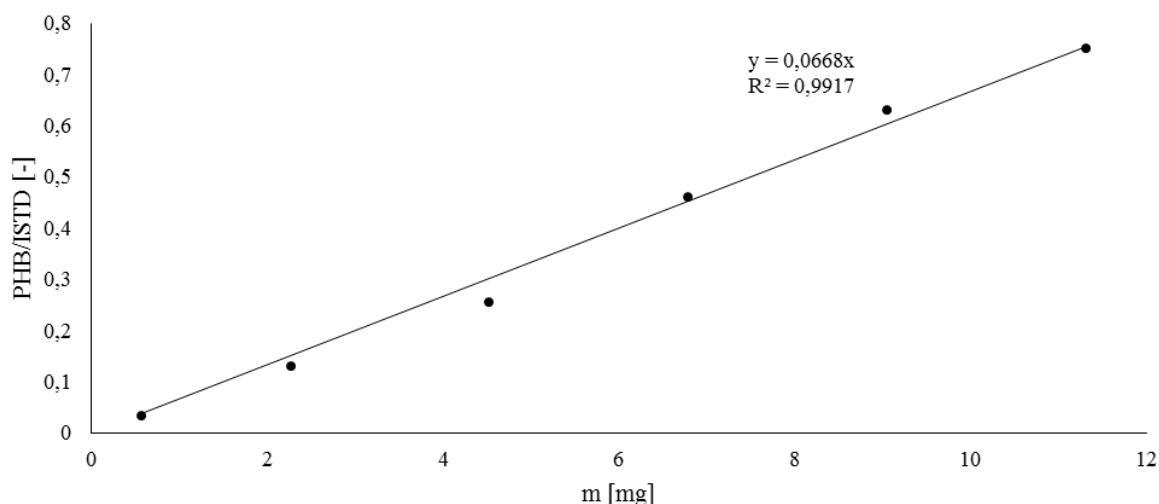


Obrázek 13: závislost povrchového napětí suspenze buněk kultur *Burkholderia sacchari* z Petriho misek pro počáteční optické hustoty a) 0,3; b) 0,6; c) 1,2

Pro vzorky bakterií *Burkholderia cepacia* i *Burkholderia sacchari* všech počátečních optických hustot nebylo pozorováno ovlivňování povrchového napětí vody přítomností jak planktonických buněk, tak těch které byly odebrány z Petriho misek. Grafická závislost povrchového napětí na době života bubliny je pro všechny připravené vzorky téměř identická a povrchové napětí vody se mění jen minimálně. Vlastnosti těchto buněk nelze tedy danou metodou porovnat. Je pravděpodobné, že větší vliv na povrchové napětí vody by byl pozorovatelný při použití suspenzí buněk s vyšších počáteční optickou hustotou.

4.3 Stanovení PHA plynovou chromatografií

Pro stanovení polyhydroxyalkanoátů ve vzorku bakteriálních buněk bylo nutné nejprve sestavit kalibrační křivku. Kalibrační křivka pro polyhydroxybutyrát, P(3HB), byla sestavena ředěním zásobního roztoku výše uvedeným způsobem a analýzou připravených roztoků pomocí plynového chromatografu s plamenovým ionizačním detektorem. Následně byla vynesena grafická závislost plochy píku na obsahu P(3HB), kterou znázorňuje Obrázek 14.



Obrázek 14: závislost plochy píku na koncentraci P(3HB)

Při stanovování obsahu polyhydroxybutyrátu byly porovnávány jak hodnoty pro biofilmové a planktonické buňky odebrané z bioreaktoru *Burkholderia cepacia*, tak pro buňky odebrané z Petriho misek a planktonické buňky *Burkholderia cepacia* i *Burkholderia sacchari*. Výsledky uvádí Tabulka 1.

Tabulka 1: obsah PHA v jednotlivých typech buněk

Kultura	koncentrace P(3HB) v sušině [%]	
	biofilmové buňky (buňky z misek)	planktonické buňky
biofilm <i>Burkholderia cepacia</i>	5,9	26,9
<i>Burkholderia cepacia</i> z Petriho misek	52,6±7,6	69,4±13,8
	64,6±6,0	71,5±5,9
<i>Burkholderia sacchari</i> z Petriho misek	39,6±3,1	57,0±3,6
	58,3±1,7	56,4±0,2
	49,1±0,1	56,8±1,1

Z výše uvedené tabulky vyplývá, že jak buňky bakteriálního biofilmu *Burkholderia cepacia*, tak buňky odebrané z kultur Petriho misek *Burkholderia cepacia* i *Burkholderia sacchari* obsahují poměrně menší množství polyhydroxybutyrátu než buňky planktonické. Nejvyšší rozdíl byl pozorován u bakteriálního biofilmu. U tohoto typu kultury nebylo možné ale provést další kontrolní měření z důvodu malého množství vytvořených buněk.

Rozdíl obsahu polyhydroxyalkanoátů v planktonických a biofilmových buňkách *Burkholderia cepacia* mohl být způsoben vyšší energetickou náročností procesu vzniku bakteriálního biofilmu a buňky proto primárně využívají energii a uhlíkaté substráty k biosyntéze extracelulární matrix. Dalším možným vysvětlením je, že jakmile dojde k vytvoření bakteriálního biofilmu, jsou buňky lépe chráněny před stresovými okolního prostředí ať už díky tvorbě extracelulární matrix nebo například díky regulátorům stresové odpovědi, jak je popsáno v odstavci 2.3.3. Tvorba extracelulární matrix může být jedním z dalších vysvětlení takto vysokých rozdílů mezi jednotlivými typy buněk. Vzorky byly před vysušením čištěny pomocí centrifugace. Je ale možné, že se část matrix nepodařilo odstranit. Polyhydroxyalkanoáty bývají kumulovány pouze v buňkách bakterií a v extracelulární matrix se nevyskytují. Pokud tedy přítomnost extracelulární matrix ovlivňovala hmotnost daného vzorku, mohlo dojít k stanovení nižšího procentuálního obsahu PHA v biofilmových buňkách. U kultur z Petriho misek *Burkholderia cepacia* i *Burkholderia sacchari* nebyl rozdíl mezi obsahem polyhydroxybutyrátu v jednotlivých typech buněk tak zásadní jako u buněk biofilmu *Burkholderia cepacia*. Stanovené rozdíly mohly být způsobeny odlišným způsobem kultivace buněk. Přisedlé buňky tedy vytváří menší množství polyhydroxyalkanoátů než volné planktonické.

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo prostudovat některé základní biologické, chemické a fyzikální vlastnosti biofilmů bakterií *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*, konkrétně hydrofobní vlastnosti, velikost buněk, Zeta potenciál a schopnost produkovat polyhydroxyalkanoáty. Pro porovnání vlastností jednotlivých typů buněk byly použity dva typy kultur, a to kultury kultivované ve speciálním bioreaktoru umožňující tvorbu biofilmu a kultury z Petriho misek.

První se studovaných vlastností buněk byla hydrofobicita, která byla stanovována pomocí metody BATH. Hydrofobní vlastnosti buněk se podílejí na ulpívání buněk na povrchu a tím i na tvorbě bakteriálního biofilmu. Proto bylo porovnáváno množství buněk, které se naadsorbuje na rozhraní hydrofobní a hydrofilní fáze, případně přejde do fáze hydrofobní. Touto metodou byly zkoumány volné planktonické buňky i buňky přisedlé, ať už biofilmové či odebrané z Petriho misek. Bylo zjištěno, že biofilmové buňky *Burkholderia cepacia* mají vyšší afinitu k hydrofobní fázi než buňky planktonické, jak při použití hexadekanu, tak i minerálního oleje jako hydrofobní fáze. U kultur z Petriho misek *Burkholderia cepacia* bylo ale zjištěno, že dochází ochotněji k přestupu planktonických buněk do hexadekanu, než tomu bylo u buněk z Petriho misek. Při použití minerálního oleje pak opět vystupovaly přisedlé buňky z misek hydrofobněji než volné planktonické. Celkově je možné konstatovat, že bakterie *Burkholderia cepacia* vykazovala výrazně hydrofobnější charakter než *Burkholderia sacchari*. U bakterie *Burkholderia sacchari* měly buňky odebrané z Petriho misek vyšší afinitu k hydrofobní fázi než buňky planktonické. V porovnání s *Burkholderia cepacia* však byly tyto hodnoty nižší i o 80 %.

Dále byl studován rozdíl velikostí jednotlivých typů buněk. Bylo zjištěno, že biofilmové buňky *Burkholderia cepacia* jsou větší než buňky planktonické. U kultur z Petriho misek obou bakterií nebyl zjištěn tak výrazný rozdíl ve velikosti jednotlivých typů buněk. U obou typů přisedlých buněk *Burkholderia cepacia* i *Burkholderia sacchari* byl ale pozorován trend snižování velikosti buněk obsažených ve vodní fázi v pořadí před smícháním s hydrofobní fází, po smíchání s hexadekanem a na konec s minerálním olejem.

Následně byl u těchto vzorků stanovován Zeta potenciál. Pro oba typy kultur i druhů bakterií se naměřené hodnoty příliš nelišily, pohybovaly se ale v intervalu -30 – 30 mV. Pro soustavy s tímto Zeta potenciálem platí, že jsou koloidně nestabilní a mají tendenci agregovat.

Hydrofobní vlastnosti buněk byly dále studovány pomocí tenziometrie využívající Du Noüyho kroužek a také metody maximálního tlaku bubliny. Vliv přítomnosti bakterií na povrchové napětí vody se projevoval pouze u měření s Du Noüyho kroužkem. Pro buňky odebrané z Petriho misek i planktonické obou druhů bakterií docházelo k mírnému snižování povrchového napětí vody. Výraznější rozdíly byly pozorovány u buněk planktonických, zároveň byly mezi jednotlivými měřeními tohoto typu buněk stanoveny vyšší směrodatné odchylky než u buněk odebraných z Petriho misek. Pro přesnější posouzení vlivu přítomnosti bakteriálních buněk na povrchové napětí by tak pravděpodobně bylo potřeba použít vzorky s vyšší koncentrací buněk.

Poslední studovanou vlastností byla schopnost jednotlivých typů buněk akumulovat polyhydroxyalkanoáty. Pro buňky biofilmu *Burkholderia cepacia* bylo zjištěno, že planktonické buňky akumulují poměrně větší množství polyhydroxyalkanoátů než buňky

biofilmové. U kultur z Petriho misek *Burkholderia cepacia* i *Burkholderia sacchari* bylo také stanoveno odlišné množství polyhydroxybutyrátu obsaženého v obou typech buněk, tento rozdíl ale nebyl tak výrazný jako u prvně zmiňované kultury.

LITERATURA

- [1] SINGH, Rajbir, Debarati PAUL a Rakesh K. JAIN. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology* [online]. 2006, **14**(9), 389-397 [cit. 2017-02-18]. DOI: 10.1016/j.tim.2006.07.001. ISSN 0966842x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X06001569>
- [2] MARIC, Svjetlana a Jasmina VRANES. Characteristics and significance of microbial biofilm formation. *PERIODICUM BIOLOGORUM*. 2007, **109**(2), 115-121. ISSN 0031-5362.
- [3] CHIARINI, Luigi, Annamaria BEVIVINO, Claudia DALMASTRI, Silvia TABACCHIONI a Paolo VISCA. Burkholderia cepacia complex species: health hazards and biotechnological potential. *Trends in Microbiology* [online]. 2006, **14**(6), 277-286 [cit. 2017-02-18]. DOI: 10.1016/j.tim.2006.04.006. ISSN 0966842x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X06000990>
- [4] SHOMMU, Nusrat S., Hans J. VOGEL a Douglas G. STOREY. Potential of metabolomics to reveal Burkholderia cepacia complex pathogenesis and antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2015, **6**, - [cit. 2017-02-18]. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00668. ISSN 1664-302x. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00668/abstract>
- [5] QUON, Bradley S a Steven M ROWE. New and emerging targeted therapies for cystic fibrosis. *BMJ* [online]. , i859- [cit. 2017-02-18]. DOI: 10.1136/bmj.i859. ISSN 1756-1833. Dostupné z: <http://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.i859>
- [6] PAN, Wenyang, Joseph A. PERROTTA, Arthur J. STIPANOVIC, Christopher T. NOMURA a James P. NAKAS. Production of polyhydroxyalkanoates by Burkholderia cepacia ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosic hydrolysate. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 2012, **39**(3), 459-469 [cit. 2017-02-27]. DOI: 10.1007/s10295-011-1040-6. ISSN 13675435. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-011-1040-6>
- [7] CESÁRIO, M. Teresa, Rodrigo S. RAPOSO, M. Catarina M.D. de ALMEIDA, Frederik VAN KEULEN, Bruno S. FERREIRA, João P. TELO a M. Manuela R. da FONSECA. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by Burkholderia sacchari using wheat straw hydrolysates and gamma-butyrolactone. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2014, **71**, 59-67 [cit. 2017-02-27]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.04.054. ISSN 01418130. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813014002815>
- [8] TOYOFUKU, Masanori, Tomohiro INABA, Tatsunori KIYOKAWA, Nozomu OBANA, Yutaka YAWATA a Nobuhiko NOMURA. Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. 2015, , 1-6 [cit. 2017-02-18]. DOI: 10.1080/09168451.2015.1058701. ISSN 0916-8451. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09168451.2015.1058701>
- [9] DONLAN, Rodney M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 2002, **8**(9), 881-890 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.3201/eid0809.020063. ISSN 1080-6040. Dostupné z: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/9/02-0063_article.htm

- [10] DUNNE, W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2002, **15**(2), 155-166 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1128/CMR.15.2.155-166.2002. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.15.2.155-166.2002>
- [11] CHOI, Na-Young, Bo-Ram KIM, Young-Min BAE a Sun-Young LEE. Biofilm formation, attachment, and cell hydrophobicity of foodborne pathogens under varied environmental conditions. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* [online]. 2013, **56**(2), 207-220 [cit. 2017-02-26]. DOI: 10.1007/s13765-012-3253-4. ISSN 1738-2203. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13765-012-3253-4>
- [12] GARRETT, Trevor Roger, Manmohan BHAKOO a Zhibing ZHANG. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science* [online]. 2008, **18**(9), 1049-1056 [cit. 2017-02-26]. DOI: 10.1016/j.pnsc.2008.04.001. ISSN 10020071. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1002007108002049>
- [13] KRIVOROT, M., A. KUSHMARO, Y. OREN a Jack GILRON. Factors affecting biofilm formation and biofouling in membrane distillation of seawater. *Journal of Membrane Science* [online]. 2011, **376**(1-2), 15-24 [cit. 2017-02-26]. DOI: 10.1016/j.memsci.2011.01.061. ISSN 03767388. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738811000810>
- [14] ABDEL-AZIZ, Shadia M. a Aeron A. Bacterial Biofilm: Dispersal and Inhibition Strategies. *Scholarena Journal of Biotechnology* [online]. 2014, **1**(1), - [cit. 2017-02-27]. DOI: 10.18875/2375-6713.1.105. ISSN 23756713. Dostupné z: <http://fulltext.scholarena.com/Bacterial-Biofilm-Dispersal-and-Inhibition-Strategies.php>
- [15] DUFOUR, Delphine, Vincent LEUNG a Céline M. LÉVESQUE. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics* [online]. 2010, **22**(1), 2-16 [cit. 2017-02-27]. DOI: 10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x. ISSN 16011538. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x>
- [16] DONLAN, Rodney M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 2002, **8**(9), 881-890 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.3201/eid0809.020063. ISSN 1080-6040. Dostupné z: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/9/02-0063_article.htm
- [17] RUTHERFORD, S. T. a B. L. BASSLER. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2012, **2**(11), a012427-a012427 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.1101/cshperspect.a012427. ISSN 2157-1422. Dostupné z: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a012427>
- [18] JEFFERSON, Kimberly K. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2004, **236**(2), 163-173 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09643.x. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09643.x>

- [19] DONLAN, R. M. a J. W. COSTERTON. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2002, **15**(2), 167-193 [cit. 2017-03-03]. DOI: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- [20] GAMBINO, Michela a Francesca CAPPITELLI. Mini-review: Biofilm responses to oxidative stress. *Biofouling* [online]. 2016, **32**(2), 167-178 [cit. 2017-03-03]. DOI: 10.1080/08927014.2015.1134515. ISSN 0892-7014. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08927014.2015.1134515>
- [21] KRASOWSKA, Anna a Karel SIGLER. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2014, **4**, - [cit. 2017-02-27]. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00112. ISSN 22352988. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00112/abstract>
- [22] CERCA, Nuno, Gerald B. PIER, Manuel VILANOVA, Rosário OLIVEIRA a Joana AZEREDO. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Research in Microbiology* [online]. 2005, **156**(4), 506-514 [cit. 2017-02-27]. DOI: 10.1016/j.resmic.2005.01.007. ISSN 09232508. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250805000185>
- [23] REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI a V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* [online]. 2003, **87**(2), 137-146 [cit. 2017-03-04]. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852402002122>
- [24] SINGH SAHARAN, Baljeet, Anita GREWAL a Pardeep KUMAR. Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments. *Chinese Journal of Biology* [online]. 2014, **2014**, 1-18 [cit. 2017-02-26]. DOI: 10.1155/2014/802984. ISSN 23147474. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/archive/2014/802984/>
- [25] TRIBELLI, Paula M. a Nancy I. LÓPEZ. Poly(3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions. *Extremophiles* [online]. 2011, **15**(5), 541-547 [cit. 2017-02-26]. DOI: 10.1007/s00792-011-0384-1. ISSN 14310651. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00792-011-0384-1>
- [26] RÜHS, P.A., L. BÖCKER, R.F. INGLIS a P. FISCHER. Studying bacterial hydrophobicity and biofilm formation at liquid-liquid interfaces through interfacial rheology and pendant drop tensiometry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2014, **117**, 174-184 [cit. 2017-03-04]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.02.023. ISSN 09277765. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776514000903>

- [27] WARNE ZOUEKI, Caroline, Subhasis GHOSHAL a Nathalie TUFENKJI. Bacterial adhesion to hydrocarbons: Role of asphaltenes and resins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2010, **79**(1), 219-226 [cit. 2017-02-27]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.03.054. ISSN 09277765. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092777651000202X>
- [28] WHITTAKER, A. G, A. R MOUNT a M. R HEAL. *Physical chemistry*. Oxford: BIOS, 2000, 286 s. ISBN 1-85996-194-0.
- [29] VOJUCKUJ, Sergej S. *Kurs koloidní chemie*. Praha: SNTL, 1984.
- [30] ATKINS, P. W. a Julio DE PAULA. *Fyzikální chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2013. ISBN 978-80-7080-830-6.
- [31] SOMASUNDARAN, P. *Encyclopedia of surface and colloid science*. Vol. 5. 2nd ed. New York: Taylor & Francis, c2006. ISBN 0849396158.
- [32] SOMASUNDARAN, P. *Encyclopedia of surface and colloid science*. Vol. 2. 2nd ed. New York: Taylor & Francis, c2006. ISBN 0849396158.
- [33] FAINERMAN, V.B a R MILLER. Maximum bubble pressure tensiometry—an analysis of experimental constraints. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2004, **108-109**, 287-301 [cit. 2017-02-27]. DOI: 10.1016/j.cis.2003.10.010. ISSN 00018686. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868603001568>
- [34] Bubble pressure tensiometer. *KRUSS* [online]. [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: <https://www.kruss.de/services/education-theory/glossary/bubble-pressure-tensiometer/>
- [35] MIKULČÁK, Jiří. *Matematické fyzikální a chemické tabulky pro střední školy*. 3. vyd. Praha: Prometheus, 1995. ISBN 80-85849-84-4.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DLS	dynamický rozptyl světla
CFTR	z anglického „ <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> “ protein
P(3HB)	polyhydroxybutyrát
P(3HB-co-4HB)	kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 4-hydroxybutyrátu
P(3HB-co-3HV)	kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu
EPS	extracelulární polymerní látky
QS	<i>quorum sensing</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
UV	ultrafialové záření
PHA	polyhydroxyalkanoáty
ssc-PHA	short-side-chain polyhydroxyalkanoáty
msc-PHA	medium.side-chain polyhydroxyalkanoáty
BATH	z anglického „ <i>bacterial adhesion to hydrocarbons</i> “
MATH	z anglického „ <i>microbial adhesion to hydrocarbons</i> “